

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL LIVER GROWTH FACTOR:

ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS.

TESIS DOCTORAL

CRISTINA SUSÍN LARA

MADRID, 2008



Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

SILVIA MAGDALENA ARRIBAS RODRÍGUEZ, Profesora Contratada Doctora y
MARIA DEL CARMEN GONZÁLEZ GARCÍA, Profesora Titular, pertenecientes
al Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad
Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN:

Que Doña CRISTINA SUSÍN LARA ha realizado bajo su dirección el trabajo
titulado: “Capacidad antioxidante del Liver Growth Factor: estudios *in vitro* e *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas.”, con objeto de
obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste expedimos el presente certificado en Madrid a 11 de junio de
2008.

DIRECTORAS

Silvia M. Arribas Rodríguez

M. Carmen González García

Este trabajo ha sido financiado con ayudas del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyecto BFU 2004-04148) y UAM-Comunidad Autónoma de Madrid (CAM-UAM CSB006 y CAM-UAMBio-1880-07).

DEDICATORIAS

A Dios

A mis padres

A mis abuelos

A mi familia

A Fátima y Luis

A Hajar

Agradecimientos

Gracias a Dios.

A las directoras de esta Tesis:

María del Carmen González, por el apoyo que me ha dado, por lo que me ha enseñado, por facilitarme siempre las cosas y darme buenos consejos, por su generosidad y paciencia.

Silvia Arribas, por su apoyo, entrega, dedicación, por sus enseñanzas y conversaciones, por su sencillez, optimismo y determinación.

A María Victoria Conde, por su ayuda e implicación en el trabajo.

A Juan José Díaz-Gil, por su colaboración en este trabajo.

A Ana Briones, por su generosidad.

A Beatriz Somoza, por su cordialidad.

A Marisol Fernández, por su apoyo en el trabajo.

A Esther por su amabilidad y buen humor, a Adeli, y en general, a todo el Departamento de Fisiología.

A Carmita y a Eloy por su ayuda en numerosas ocasiones, y al Departamento de Bioquímica, por facilitarnos la utilización de los equipos.

A Dolores del Servicio de Microscopía Confocal.

A María del Carmen, y a los técnicos del animalario.

A Mohamed, Ismael, Miguel, Elisa y Miguel, por su hospitalidad y cariño.

A mis amigas de la infancia Emma, Patricia, Bea, Amalia, Diana, Mónica, Bárbara; sus hijos Gonzalo y Pedro; maridos Eugenio, Borja, Javi, Pablo; amigas de la facultad Marina, Marisa, Nery, Eva, Oscar, Elena, Rosario; y a lo largo del camino he encontrado a gente muy especial que me ha alegrado el corazón: Om hair, Anisa, Ahmed, y Zainab; Hafida, Hakima, Tarek B, Tarek E, Vili, gracias a todos por darme tan buenos momentos en la vida.

A mis queridas Hajar, María del Prado y Virginia, sois más que amigas, más que hermanas.

A Fátima, “ojo mío”, que me ha dado todo y más, siempre está cuando la necesito y me hace la vida más fácil.

A Luis por su amistad, paciencia y gran apoyo, junto con Fátima, para que terminara esta Tesis. Y al pequeño Omar que viene de camino llenándonos de inmensa alegría y aires renovados.

A mis abuelos Josefina, Restituto, Adoración y Germán, cuánta sabiduría y cuánto amor me habéis dado. A la familia de Irún: tía Maruja, M^a Ángeles, Alicia, tío Agustín, Lorenzo, Carlos; primos Iñigo, Virginia y Beatriz. A la familia de Huesca: tíos Elena, Fernando, Antonia, Julián; primas M^a Elena, Aranchi, Fernando, Sara, Delia, Elenita, Enrique. A la familia de Madrid y a la de Argentina. Aunque apenas nos veamos, os quiero y os echo de menos.

A mis amados padres, Germán y Mary Carmen, que hicieron lo imposible por mí. Cada día que pasa me acuerdo más de vosotros. Gracias por lo que me habéis enseñado en la vida, y por todo el esfuerzo y sacrificio realizado. Gracias por todo el amor que me disteis.

Gracias a Muhammad (SAAWS).

Gracias a Dios por todos los que me han ayudado a lo largo de mi vida, a los que he nombrado aquí y a los que no, pero que llevo en mi corazón y en mi mente.



ÍNDICE

ÍNDICE	Página
<i>ABREVIATURAS</i>	i
<i>RESUMEN</i>	iii
INTRODUCCIÓN	1
I. LIVER GROWTH FACTOR	2
1. EFECTOS BIOLÓGICOS DEL LIVER GROWTH FACTOR	3
2. NATURALEZA QUÍMICA DEL LIVER GROWTH FACTOR	5
3. ALBÚMINA	6
4. BILIRRUBINA	8
5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA ALBÚMINA Y DE LA BILIRRUBINA..	9
II. ESTRÉS OXIDATIVO	10
1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y NITRÓGENO.....	11
1.1. Principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	12
1.2. Fuentes de especies reactivas de oxígeno	17
2. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	18
3. EFECTOS NOCIVOS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	19
4. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	22
4.1. Sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos.....	23
4.2. Sistemas de defensa antioxidante enzimáticos.....	27
III. HIPERTENSIÓN ARTERIAL	29
1. MODELO ANIMAL DE HIPERTENSIÓN ESENCIAL	33
IV. ESTRÉS OXIDATIVO E HIPERTENSIÓN ARTERIAL	34
1. PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN LA PARED VASCULAR	34
2. DAÑO PRODUCIDO POR LOS RADICALES LIBRES EN LA PARED VASCULAR	39
3. TRATAMIENTO ANTIOXIDANTE DE LA HIPERTENSIÓN	42

OBJETIVOS	45
1. HIPÓTESIS	46
2. OBJETIVOS	46
MATERIALES Y MÉTODOS	48
I. PURIFICACIÓN DEL LGF.....	49
II. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y TRATAMIENTO.....	49
III. EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	50
1. OBTENCIÓN DE PLASMA PARA DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS....	50
2. OBTENCIÓN DE TEJIDO ARTERIAL Y CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS	51
IV. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	55
1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES	55
2. EQUIPOS	56
3. MÉTODO DEL ABTS.....	56
4. MÉTODO ORAC-FL	57
5. MÉTODO DE LA DESOXIRRIBOSA.....	58
6. MÉTODO DEL LUMINOL	59
V. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES BASALES DE RADICAL ANIÓN SUPERÓXIDO Y DE LA ACTIVIDAD NAD(P)H OXIDASA.....	60
1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	60
2. EQUIPOS	60
3. MÉTODO DE LA LUCIGENINA.....	61
4. MÉTODO DEL DIHIDROETIDIO	62
4.1. Para arterias mesentéricas de resistencia.....	62
4.2. Para células musculares lisas	65
VI. DETERMINACIÓN DEL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE ENDÓGENO GLUTATIÓN EN PLASMA	66
1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	66
2. EQUIPOS	66
3. MÉTODO DTNB	67
4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATIÓN REDUCTASA.....	68

VII. MEDIDAS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA	69
1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	69
2. EQUIPOS	69
3. MÉTODO TBARS	69
VIII. ENSAYOS DE FUNCIÓN VASCULAR EN ARTERIAS AISLADAS.....	70
1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	70
2. EQUIPOS	71
3. MEDIDA DE LA FUNCIÓN VASCULAR MEDIANTE REGISTRO DE LA TENSIÓN ISOMÉTRICA.....	71
4. DETERMINACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD BASAL DE ÓXIDO NÍTRICO MEDIANTE DAF2-DA	74
IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	76
RESULTADOS.....	77
I. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL LGF <i>IN VITRO</i>	78
1. CAPACIDAD PARA ELIMINAR EL RADICAL CATIÓN ABTS.....	78
2. CAPACIDAD PARA ELIMINAR EL RADICAL PEROXILO	82
3. CAPACIDAD PARA ELIMINAR EL RADICAL HIDROXILO	85
4. CAPACIDAD PARA ELIMINAR EL RADICAL ANIÓN SUPERÓXIDO	88
II. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE RATAS SHR CON LGF SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA NAD(P)H OXIDASA Y SOBRE LA PRODUCCIÓN DEL RADICAL ANIÓN SUPERÓXIDO	90
1. ACTIVIDAD NAD(P)H OXIDASA	90
2. CUANTIFICACIÓN DEL RADICAL ANIÓN SUPERÓXIDO	92
III. REDUCCIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO POR EL TRATAMIENTO DE RATAS SHR CON LGF	96
1. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	96
2. PROTECCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO FRENTE A ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	96
IV. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE RATAS SHR CON LGF SOBRE EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE ENDÓGENO GLUTATIÓN.....	100
1. CUANTIFICACIÓN DEL GLUTATIÓN TOTAL.....	100
2. ACTIVIDAD GLUTATIÓN REDUCTASA	101

DISCUSIÓN	102
I. CAPACIDAD DEL LGF PARA ELIMINAR RADICALES LIBRES EN MEDIO ACUOSO.....	106
II. EFECTO <i>IN VIVO</i> DEL LGF	112
1. PRODUCCIÓN DE RADICAL ANIÓN SUPERÓXIDO.....	113
2. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE RATAS SHR CON LGF SOBRE EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE GLUTATIÓN	117
III. REDUCCIÓN DEL DAÑO PRODUCIDO POR ESTRÉS OXIDATIVO POR EL TRATAMIENTO DE RATAS SHR CON LGF	118
IV. PROTECCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO FRENTE A RADICALES LIBRES DE OXÍGENO	119
CONCLUSIONES	121
REFERENCIAS.....	125
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	155

ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ACh	Acetilcolina
AMR	Arteria mesentérica de resistencia
Ang	Angiotensina
ARA	Antagonistas de receptores de angiotensina
AT	Receptores de angiotensina
CAT	Catalasa
CML	Células de músculo liso
DAF2-DA	Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína
DPI	Difenil iodonio
EDCFs	Factores contráctiles derivados del endotelio
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
GC	Guanilato ciclasa
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
gp91	Glicoproteína 91
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HCIO	Ácido hipocloroso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HOO·	Radical hidroperóxido
HTA	Hipertensión arterial
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular-1
IECAs	Inhibidores del enzima convertora de angiotensina
LGF	Liver Growth Factor
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil ester
MDA	Malonaldehído o malondialdehído
Mn-SOD	Manganeso-superóxido dismutasa
MPO	Mieloperoxidasa
NAD(P)H	Dinucleótido fosfato de adenin nicotinamida

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
$^3\text{O}_2$	Oxígeno molecular o triplete inerte
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Radical anión superóxido
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo
$\text{OONO}^{\cdot-}$	Peroxinitrito
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PGI_2	Prostaciclina
$\text{RO}\cdot$	Radical alcoxilo
$\text{ROO}\cdot$	Radical peroxilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAR	Seroalbúmina de rata
SD	Rata Sprague Dawley
SHR	Rata espontáneamente hipertensa
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
$\text{TNF-}\alpha$	Factor de necrosis tumoral α
VCAM-1	Molécula de adhesión endotelial vascular-1
VEGFR-2	Receptor-2 del factor de crecimiento endotelial vascular
WKY	Rata Wistar Kyoto

RESUMEN

Introducción. Considerando: 1) los efectos regenerativos del LGF –complejo de albúmina-bilirrubina con enlace covalente- en ratas SHR; 2) las propiedades antioxidantes de la albúmina, la bilirrubina y de sus complejos no covalentes y 3) la importancia creciente de los tratamientos antioxidantes en la terapia de la enfermedad cardiovascular; los **objetivos** de la Tesis Doctoral son estudiar los potenciales efectos antioxidantes del LGF, determinando: 1) su capacidad para eliminar diversos radicales libres en un medio acuoso; 2) la capacidad del tratamiento con LGF en ratas SHR para reducir la producción de radicales libres de la pared vascular y/o de estimular los sistemas endógenos de defensa antioxidante. **Métodos.** Se determinó en medio acuoso la capacidad del LGF para eliminar radical ABTS (estudio espectofotométrico); radical peroxilo (estudio fluorimétrico); el radical hidroxilo (estudio espectofotométrico y quimioluminiscencia) y radical anión superóxido (reactividad vascular en arterias carótidas de rata SD). En arterias de ratas SHR, WKY y SHR tratadas con LGF (4 dosis de 4,5 µg/ día a lo largo de 12 días. Se determinó: 1) la producción de anión superóxido vascular (quimioluminiscencia y tinción con dihidroetidio y microscopía confocal de fluorescencia); 2) medidas de glutatión y actividad de la enzima glutatión reductasa en plasma; 3) medidas de peroxidación lipídica en plasma y 4) biodisponibilidad de NO vascular (tinción con DAF-2 y microscopía confocal de fluorescencia). **Resultados y conclusiones.** El LGF ejerce acciones antioxidantes por eliminación de radicales libres que son deletéreos para la pared vascular. Esta capacidad se produce a concentraciones molares muy bajas e inferiores a las que necesitan para realizar una función antioxidante la bilirrubina y la albúmina por separado. Esto sugiere que el LGF podría constituir un sistema de defensa antioxidante endógeno circulante e indica la importancia que tiene su enlace covalente y conformación para realizar efectos antioxidantes. Por otra parte, el tratamiento de ratas SHR con LGF reduce la producción del radical anión superóxido mediante la enzima NAD(P)H oxidasa y aumenta los niveles endógenos de defensa antioxidante. Estas acciones antioxidantes del tratamiento con LGF pueden explicar, en parte, la mejora de la función y estructura vascular en la rata SHR observadas en el estudio anterior con este compuesto.

INTRODUCCIÓN

I. LIVER GROWTH FACTOR

El hígado es un órgano con una gran capacidad de regeneración. Después de una hepatectomía parcial del 66% del hígado, se inicia la síntesis de ADN en las células de la porción de hígado sano de forma que, en el plazo de 8 a 10 días, se recupera el peso total (Bucher y Malt, 1971). Entre los diversos mecanismos que se han propuesto para explicar la gran capacidad de regeneración del hígado está la existencia de un factor o factores humorales de crecimiento en animales parcialmente hepatomizados. Durante las décadas de los años 60 y 70 se realizaron numerosos experimentos, tanto *in vivo* como *in vitro*, para tratar de demostrar la existencia de este o estos factores en la sangre de animales sujetos a hepatectomía parcial. Entre otros, Moolten y Bucher (1967), en experimentos de circulación cruzada entre ratas parcialmente hepatomizadas y ratas normales observaron un aumento de la síntesis de ADN y de proteínas en el hígado de las ratas sanas. La adición de suero procedente de las ratas parcialmente hepatomizadas (y no de las ratas normales) a hepatocitos en cultivo, aumentaba la síntesis de proteínas y la captación de [³H] timidina. Este hecho indica un aumento de la proliferación celular (Fisher y cols., 1971a, 1971b; Paul y cols., 1972) con lo que demostraron que el factor humoral responsable de la regeneración del hígado se encontraba en la sangre y que su concentración aumentaba cuanto mayor era la cantidad de hígado eliminado.

Después de varios intentos para purificar este factor de crecimiento en suero, plasma, extractos de hígado o plaquetas (Morley y Kingdon, 1973; Goldberg y cols., 1980, LaBrecque y Bachur, 1982, Russell y cols., 1984), en 1986 Díaz-Gil y colaboradores consiguieron purificar del plasma procedente de ratas parcialmente hepatomizadas una molécula de 66 kDa que, inyectada en ratones a dosis de nanogramos, era capaz de estimular, por sí sola, la síntesis de ADN y el índice mitótico de hepatocitos. Poseía igualmente actividad *in vitro* en

cultivo primario de hepatocitos de rata, estimulando la síntesis de ADN, incrementado la cantidad de proteína total hasta 96 horas después de su adición, activando la captación de sodio en los primeros minutos y la actividad del sistema A de transporte de aminoácidos (Díaz-Gil y cols., 1986a). A este factor se le denominó Liver Growth Factor (LGF).

El LGF es un factor indetectable en el suero de los individuos sanos tanto en el ser humano como en las ratas, pero su concentración se incrementa cuando se produce un daño hepático o hepato-biliar (Díaz-Gil y cols., 1986b, 1988, 1989). Por ejemplo, la presencia del LGF se detecta en el plasma de la rata después de la inyección de hepatotoxinas, y es proporcional al grado de necrosis hepatocelular. Se ha demostrado que el factor desaparece cuando la rata se recupera de la agresión hepatotóxica (Díaz-Gil y cols., 1987b). También se ha demostrado que el plasma procedente de pacientes con hepatitis B, inyectado a ratones sanos por vía intraperitoneal tiene la capacidad de promover la síntesis de ADN en el hígado, mientras que una inyección de plasma procedente de sujetos sanos no produce este efecto (Díaz-Gil y cols., 1986b).

1. EFECTOS BIOLÓGICOS DEL LIVER GROWTH FACTOR

Los efectos más estudiados del LGF han sido los que ejerce como mitogéno en hígado. Así, se ha demostrado que la inyección de este factor a ratas normales (4,5 µg/rata, una inyección cada 3-4 días), provoca un crecimiento de la masa hepática, presenta máximos de síntesis de ADN a las 24 horas de cada inyección, y de proteínas y peso seco de hígado a las 48 horas, disminuyendo en los días siguientes. También se conoce que produce un incremento de células "PCNA-positivas" y del índice mitótico sin producir efectos degenerativos (no hay aparición de fibrosis ni amiloides) (Díaz-Gil y cols., 1994). La acción del LGF no parece perturbar la homeostasis, puesto que un año después de la inyección de LGF, el hígado, el páncreas, los riñones y el bazo no tenían signos de degeneración o de fibrosis (Díaz-Gil y cols., 1994).

Otra de las características del LGF es su actividad antifibrótica. Así, en un modelo de ratas con cirrosis inducida por CCl₄, una vez llegado a una situación de cirrosis irreversible, el tratamiento con LGF produjo una reducción significativa del colágeno hepático. Asimismo, el tratamiento mejoró de forma significativa la reestructuración del parénquima hepático, así como la inflamación y la necrosis. También aumentó la funcionalidad hepática y produjo recuperación de diversas funciones hemodinámicas como la presión portal, la presión arterial, la derivación porto-sistémica y la resistencia vascular sistémica, y redujo la ascitis (Díaz Gil y cols., 1999).

En el hígado de la rata el mecanismo de acción del LGF está mediado por TNF- α , ya que la inyección de las ratas con anticuerpo anti-TNF- α antes del tratamiento con LGF disminuye los efectos mitogénicos de éste -aumento de la síntesis de ADN y células PCNA-positivas-. Este estudio también ha demostrado que la expresión de TNF- α tras el tratamiento con LGF se produce en el endotelio de la vena porta, lo que sugiere que la célula diana del LGF es la célula endotelial. Asimismo, en cultivos de células endoteliales humanas (HUVEC), el LGF estimula la secreción de TNF- α . Es de destacar que esta secreción es muy inferior (del orden de pg/ml) a la que se produce en los procesos inflamatorios. De hecho, los efectos del LGF en HUVEC mediados por TNF- α no incrementan las citocinas inflamatorias ICAM-1 o VCAM-1 (Díaz Gil y cols., 2003).

Más recientemente se ha observado que el LGF muestra actividad biológica en tejidos extrahepáticos y puede ser útil en terapias neuroregenerativas. En un modelo de Parkinson en rata -inducido por denervación de neuronas dopaminérgicas mediante 6-hidroxidopamina- la infusión intraventricular de LGF aumentó significativamente la innervación en el *estriatum*, ya que aumentó las terminaciones nerviosas positivas a tirosina hidroxilasa e indujo la proliferación de la microglia (Reimers y cols., 2006). El tratamiento con LGF de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) reduce la presión arterial y mejora la estructura y la función vascular (Somoza y cols.,

2006). Otras funciones extrahepáticas descritas recientemente son la gran actividad angiogénica del LGF en el testículo, donde incrementa VEGFR2 (Martínez-Galán y cols., 2005), y en el lecho subcutáneo (comunicación personal del Dr. Díaz-Gil), y en un modelo de fibrosis pulmonar en rata (Martín-Hidalgo y cols., 2007).

2. NATURALEZA QUÍMICA DEL LIVER GROWTH FACTOR

La caracterización química del LGF demostró que esta molécula tiene seroalbúmina en su composición. Así, el LGF presenta una composición de aminoácidos casi idéntica a la albúmina e igualdad de mapas trípticos, así como de espectros de absorbancia y fluorescencia. También tiene un dicroísmo circular muy parecido, los mismos determinantes antigénicos e igual movilidad electrofóretica. Asimismo, el tiempo de vida media del LGF es de 20 a 21 días, similar al de la albúmina (Díaz-Gil y cols., 1987a).

El hecho de que la seroalbúmina no tenga actividad mitogénica en hígado, sugirió que el LGF tenía que contener otro compuesto que, por sí mismo o formando un complejo con la albúmina, produjera actividad biológica. Este segundo compuesto es la bilirrubina. Para demostrar que el LGF era un complejo de seroalbúmina y bilirrubina, Díaz-Gil y colaboradores sintetizaron *in vitro* complejos albúmina-bilirrubina y demostraron que cuando se incubaba bilirrubina con albúmina en una relación molar igual a 1 ó 2 se formaba un complejo que simulaba la acción del LGF como mitógeno. En cambio, la albúmina o la bilirrubina por sí mismas no presentaban actividad mitótica en hígado al ser inyectada a ratones (Díaz-Gil y cols., 1987a). Otros autores han corroborado que el complejo albúmina-bilirrubina, inyectado en pequeñas dosis a ratas parcialmente hepatectomizadas, aumenta la actividad mitótica en el hígado y en el bazo de estas ratas (Abakumova y cols., 1994).

El hecho de que la bilirrubina tampoco presentara actividad mitótica sugería que en la molécula de LGF la unión de la albúmina y la bilirrubina producía algún cambio de conformación de la albúmina que podría explicar la actividad del complejo (Díaz-Gil y cols., 1987a). Se conoce que la albúmina y la bilirrubina pueden unirse mediante enlaces no covalentes y enlaces covalentes. Cuando la albúmina se une de forma covalente a la bilirrubina se le denomina bilirrubina δ o biliproteína. La biliproteína se detecta en suero de pacientes con colestasis y alteraciones hepatobiliares, tiene una semivida plasmática prolongada, igual que la albúmina (Weiss y cols., 1983; Gautam y cols., 1984; Reed y cols., 1988; Higashijima y cols., 1996). La caracterización definitiva del LGF procedente de ratas parcialmente hepatomizadas (Díaz-Gil y cols., 1988) y de humanos con hepatitis (Díaz-Gil y cols., 1989), demostró en ambos casos que este complejo se trataba de bilirrubina δ o biliproteína, es decir un complejo de albúmina y bilirrubina con un enlace covalente. Estos autores determinaron la concentración del complejo albúmina-bilirrubina en plasma de ratas a diferentes tiempos después de la hepatectomía parcial y de las mismas muestras de plasma purificaron LGF. La relación entre ambas magnitudes dio un coeficiente de correlación de 0.999, lo que indicaba que el LGF era bilirrubina δ . Hasta este momento la actividad biológica de la bilirrubina δ era completamente desconocida.

3. ALBÚMINA

La albúmina es una proteína muy hidrosoluble de 66 kDa, que se encuentra en gran cantidad en el plasma sanguíneo. La concentración plasmática normal oscila entre 35 y 50 g/l y supone un 65% de la proteína plasmática total (Greger y Windhorst, 1996; Ghuman y cols., 2005; Kasper y cols., 2008; Roche y cols., 2008). Además de la albúmina del suero o seroalbúmina, existe albúmina en la clara de huevo (ovoalbúmina) y en la leche (lactoalbúmina).

La albúmina, además de ser el determinante principal de la presión oncótica, cumple otras funciones entre las que se puede destacar su función como proteína transportadora de diversas hormonas -como las tiroideas y las hormonas liposolubles-, numerosos fármacos, así como ácidos grasos libres. La albúmina también es el transportador en suero de la bilirrubina, ya que ésta es liposoluble (Evans, 2002; Kasper y cols., 2008).

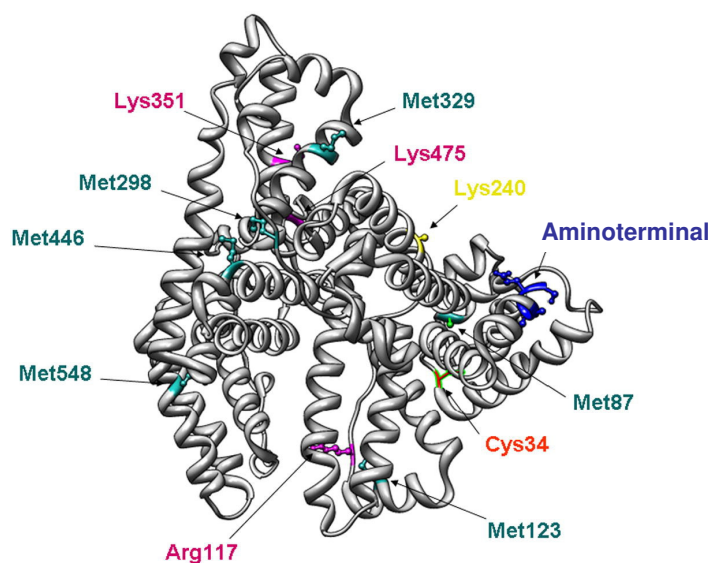


Figura 1. Estructura química de la albúmina (Roche y cols., 2008).

La albúmina se sintetiza casi exclusivamente en los hepatocitos. Es una proteína con vida media muy larga, de 15 a 20 días y se degrada alrededor del 4% por día. La albúmina presenta muy poca excreción renal -con la excepción de patologías que conllevan daño renal en las que se pierde una importante cantidad de albúmina por la orina-, debido principalmente a su tamaño y también en parte a su carga negativa (Greger y Windhorst, 1996).

4. BILIRRUBINA

La bilirrubina es un pigmento tetrapirrólico que se produce durante la degradación del grupo hemo. Entre 70 y 80% de los 250 a 300 mg de bilirrubina que se forman cada día proceden de la degradación de la hemoglobina de los eritrocitos envejecidos. El resto proviene de la destrucción prematura de los eritrocitos en la médula ósea y del recambio de las hemoproteínas (mioglobina y citocromos) presentes en todos los tejidos corporales.

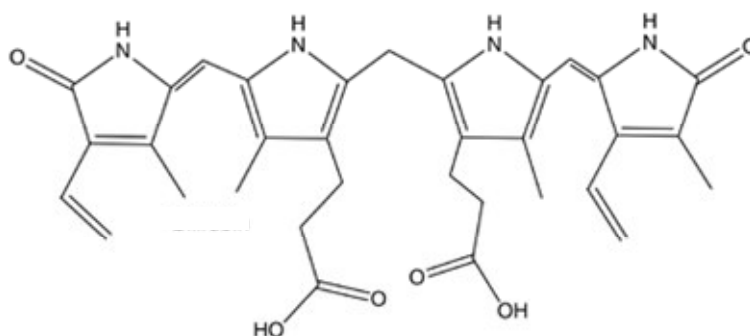


Figura 2. Estructura química de la bilirrubina. (Clark y Sharp, 2006)

La bilirrubina se forma en las células reticuloendoteliales, principalmente el bazo y el hígado, mediante dos reacciones enzimáticas. Primero, la enzima hemo oxigenasa oxida el grupo hemo dando como productos biliverdina, monóxido de carbono y hierro, y a continuación, la biliverdina reductasa reduce la biliverdina para formar la bilirrubina. La configuración de la bilirrubina hace que sea prácticamente insoluble en agua, debido a los residuos hidrófobos que quedan en la parte externa de la molécula, lo que le hace un compuesto potencialmente tóxico. Para ser transportada en sangre la bilirrubina debe ser soluble, lo cual se logra por su unión no covalente reversible a la albúmina. La bilirrubina no conjugada ligada a albúmina es transportada hasta el hígado, donde es captada por los hepatocitos dejando la albúmina libre en el plasma. En el interior del hepatocito la bilirrubina se solubiliza al conjugarse con el ácido glucurónico. La bilirrubina conjugada forma parte de la bilis que finalmente se secreta al intestino delgado. El 80 y 90% de la bilirrubina se elimina como urobilinógeno en las heces,

y el resto es de nuevo absorbida de forma pasiva por la mucosa intestinal, a través de la vena porta llega al hígado donde es captada en su mayor parte por los hepatocitos y sólo una pequeña porción es eliminada por la orina (Kasper, 2008).

5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA ALBÚMINA Y DE LA BILIRRUBINA

Diversos estudios indican que la albúmina tiene capacidad antioxidante (Evans, 2002; Oetti y cols., 2008; Roche y cols., 2008). Los efectos antioxidantes de la albúmina están relacionados con la facilidad para unirse a numerosas moléculas, como iones metálicos, ácidos grasos, drogas y también hormonas (Roche y cols., 2008). Su capacidad para ligar iones metálicos como el cobre (II) y el hierro (II) es particularmente importante ya que están implicados en la formación de las especies reactivas de oxígeno. También es importante su capacidad de unión a ácidos grasos libres, habiéndose demostrado que el impacto patogénico de niveles elevados de ácidos grasos libres es mayor si existe deficiencia de albúmina (Roche y cols., 2008). En tercer lugar, la albúmina puede ejercer capacidad antioxidante por la presencia de aminoácidos como cisteína, triptófano, tirosina, histidina, o metionina, que poseen un átomo de hidrógeno en su cadena lateral, que puede ceder fácilmente (Aliaga y Lissi, 2000; Nadal y cols., 2007). Además, algunos estudios epidemiológicos demuestran que los bajos niveles de albúmina están asociados con el incremento en el riesgo de mortalidad cardiovascular (Zoccali y cols., 2005).

En cuanto a la bilirrubina también existen evidencias epidemiológicas que indican que los bajos niveles de bilirrubina en suero se asocian con un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular (Mayer, 2000; Lin y cols., 2006; Perlstein y cols., 2008). Debido a que la bilirrubina y compuestos relacionados poseen propiedades antioxidantes (Neuzil y Stocker, 1994; Bélanger y cols., 1997; Stocker, 2004; MacLean y cols., 2007), se ha estudiado su posible acción terapéutica antioxidante, aumentando su producción mediante la estimulación de

la hemoxigenasa (Clark y cols., 2000; Foresti y cols., 2001; Adin y cols., 2005; Abraham y cols., 2007; Chung y cols., 2008).

Por otra parte, se ha demostrado que los complejos de albúmina-bilirrubina, incluida la biliproteína también poseen propiedades antioxidantes en hepatocitos, eritrocitos y miocitos (Wu y cols., 1991; Neuzil y Stocker, 1994). Se ha descrito que, de todos ellos, la bilirrubina δ o biliproteína es el compuesto que posee una mayor actividad citoprotectora, con un efecto antioxidante incluso mayor que el producido por el ácido ascórbico (Wu y cols., 1991). Debido a la naturaleza del LGF es posible que parte de sus acciones biológicas se deban a las características antioxidantes de sus componentes o a efectos antioxidantes de la propia molécula.

II. ESTRÉS OXIDATIVO

Aproximadamente un 21% del aire que respiramos es oxígeno. El oxígeno es un elemento esencial para la vida en su papel de aceptor final de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial y es la principal fuente de energía en los organismos aerobios (Cascales, 1999; 2005). En este proceso respiratorio, la mayor parte del oxígeno se reduce a agua, pero se estima que alrededor de un 2% del oxígeno puede dar lugar a la formación de las especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS) (Davies, 1995; Richter y cols., 1995). Las ROS se generan mediante sucesivas reacciones de reducción: el oxígeno se reduce a radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), éste, a su vez, puede reducirse a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo ($\cdot OH$). Cuando en un organismo hay más especies reactivas de oxígeno de las que sus sistemas de defensa antioxidante pueden compensar, se produce el estrés oxidativo. En condiciones de estrés oxidativo las ROS producen daños irreversibles a los lípidos de la membrana, a las proteínas y al ADN que pueden inducir importantes alteraciones funcionales y estructurales en los diversos

componentes y orgánulos celulares (Kowaltowski y Vercesi, 1999; Dröge, 2002; Finkel, 2000; Cao y cols., 2007; Paravicini y Touyz, 2008; Slemmer y cols., 2008).

1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y NITRÓGENO

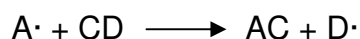
Algunas especies reactivas de oxígeno son radicales libres como el radical anión superóxido y el radical hidroxilo, otras son especies generadoras de radicales libres como el peróxido de hidrógeno. Un radical libre se define como un átomo o molécula que tiene uno o más electrones desapareados. La presencia de uno o más electrones desapareados hace que estas especies sean atraídas hacia un campo electromagnético, es decir, que sean paramagnéticas, lo que a veces les hace que sean especies altamente reactivas (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Los radicales pueden formarse a partir de una especie no radical cuando pierde o gana un electrón, o por un proceso de fisión homolítica que sucede cuando se rompe un enlace covalente y cada uno de los electrones del enlace se va a cada átomo. Para romper un enlace covalente se requiere cierta energía que puede proceder de una fuente de calor, de radiación electromagnética, etc. Los radicales libres se caracterizan por iniciar reacciones en cadena que se pueden dividir en tres fases: la fase de iniciación, la fase de propagación y la fase de terminación (Halliwell y Gutteridge, 2007).

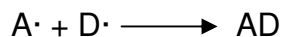
En la **fase de iniciación** se forma un radical ($A\cdot$) a partir de una especie no radical (AB):



En la **fase de propagación** el radical libre generado en la fase de iniciación, reacciona con otra especie no radical (CD) dando lugar a otro radical ($D\cdot$):



En la **fase de terminación** dos radicales libres reaccionan dando como producto una especie no radical (AD):



La reactividad química de los radicales libres se puede evaluar mediante un parámetro denominado vida media ($t_{1/2}$) de las especies químicas. La Tabla 1 muestra la vida media de algunos radicales libres (Boveris, 1998; Cascales, 1999; Delles y cols., 2008).

Tabla 1. Valores de vida media ($t_{1/2}$) de algunos radicales libres presentes en los sistemas biológicos.

Radical libre	$t_{1/2}$ (s)
Radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)	10^{-9}
Radical anión superóxido ($\cdot\text{O}_2$)	10^{-6}
Radical alcoxilo ($\text{RO}\cdot$)	10^{-6}
Radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$)	10^{-1}
Óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$)	1-10

Los radicales de mayor reactividad son los que tienen una vida media más corta, por tanto los radicales hidroxilo son los más reactivos, estos radicales reaccionan con cualquier molécula cercana. Existen otras especies con elevada reactividad, y no son radicales libres, como el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), que es un estado electrónicamente excitado del oxígeno, con una vida media de 5×10^{-6} segundos, o el peroxinitrito (ONOO^-) cuya vida media es de 0,05 a 1 segundo.

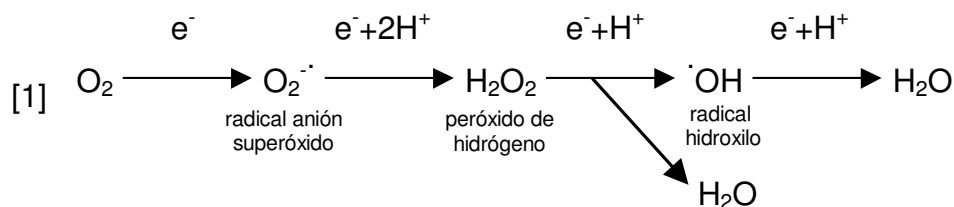
1.1. Principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

En condiciones normales, el oxígeno molecular se encuentra en estado basal o triplete inerte ($^3\text{O}_2$). A pesar de ser un “birradical libre”, el oxígeno presenta una

baja reactividad debido a que los electrones desapareados de cada átomo de oxígeno presentan espines paralelos. Sin embargo, un cambio en el estado de estos electrones puede generar otras especies tóxicas (Briviba y cols., 1997; Halliwell y Gutteridge, 2007).

La molécula de nitrógeno (N_2) se encuentra presente en un 78% en el aire que respiramos y está formada por dos átomos de nitrógeno que forman tres enlaces covalentes completos, lo que le hace una molécula estable e inerte. Cuando un átomo de nitrógeno con tres electrones desapareados, reacciona con un átomo de oxígeno con dos electrones desapareados, se produce óxido nítrico (NO), que es una molécula con un número impar de electrones ya que se forma un doble enlace completo $N=O$ y queda un electrón desapareado y deslocalizado que es el que da el carácter de radical libre al óxido nítrico. Por tanto, el óxido nítrico es un radical libre desde el punto de vista físico por poseer un electrón desapareado, pero su carácter de radical libre químico, como inductor de reacciones de propagación, no se conoce por el momento. Sin embargo, el óxido nítrico puede reaccionar fácilmente con el radical anión superóxido para formar peroxinitritos ($ONOO^-$) mediante una clásica reacción de terminación (Beckman, 1990; Richter y cols., 1995; Cascales, 1999; Ullricha y Kissnerb; 2006).

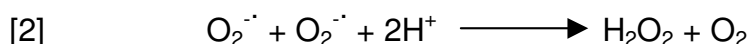
El oxígeno se puede reducir mediante una vía tetravalente, en la cadena de transporte electrónico mitocondrial, por la que capta 4 electrones y 4 protones para producir agua. O bien por una vía univalente -que se favorece por el ambiente reducido del medio intracelular y la presencia de metales- generándose las especies reactivas de oxígeno responsables de la toxicidad del oxígeno (reacción [1]). Las principales especies reactivas de oxígeno son el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Fidrovich, 1999; Cascales, 2005; Min y Jian-Xing, 2007; Szasz y cols., 2007).



La primera especie reactiva de oxígeno generada por esta vía de reducción univalente es el **radical anión superóxido**, que se forma por la reducción del oxígeno mediante la captación de un electrón procedente de la cadena respiratoria mitocondrial. El radical anión superóxido es la base conjugada de un ácido débil -el radical hidropéroxido (HOO^{\cdot})- cuyo pKa es de 4,88 (Aikens y Dix, 1991). En las proximidades de la membrana, donde se produce este radical, el pH es mucho más bajo que en el citoplasma, por lo que predominará la forma ácida o radical hidropéroxido. Debido a su carácter no iónico puede introducirse en la membrana celular y desencadenar procesos de peroxidación lipídica (Bielski, 1983; Aikens y Dix, 1991). El radical hidropéroxido es mucho más reactivo, más oxidante que el radical anión superóxido, pero en disolución acuosa a pH fisiológico predomina la forma no protonada, es decir, el radical anión superóxido.

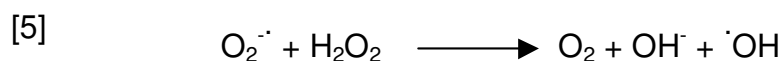
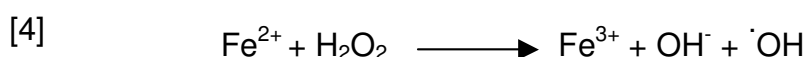
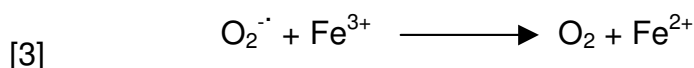
El radical anión superóxido se comporta como reductor u oxidante débil, pero tiene la capacidad de reaccionar fácilmente con el óxido nítrico dando como producto el peroxinitrito ($OONO^{\cdot}$) (Beckman y cols., 1990; Min y Jian-Xing, 2007). Los peroxinitritos intervienen en el daño oxidativo generando productos tóxicos como el 4-hidroxinonenal por peroxidación lipídica, la oxidación de los grupos carbonilos de las proteínas y la nitración de los residuos tirosina de las proteínas (3-nitrotirosina), particularmente nocivos para las células (Ischiropoulos y cols., 1992; Ischiropoulos y al-Mehdi, 1995; Ischiropoulos, 1998; Gow y cols., 2004; Hall y cols., 2004; Singh y cols., 2007).

El radical anión superóxido es más reactivo en medio hidrofóbico que en disolución acuosa, ya que en disolución acuosa se dismuta de forma espontánea (Rabani y Nielsen, 1969) o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Fridovich, 1974 y 1975), generando peróxido de hidrógeno (Wazawa y cols., 1992) (reacción [2]).



El **peróxido de hidrógeno** también puede formarse por la reducción divalente del oxígeno molecular -sin la formación del radical anión superóxido- mediante las oxidasas de los peroxisomas, enzimas que actúan como catalizadoras de la reacción. Los niveles de concentración de peróxido de hidrógeno en las células suelen ser 1000 veces mayores que los del radical anión superóxido. El peróxido de hidrógeno puede actuar como oxidante o como reductor, y es poco reactivo en disolución acuosa. Sin embargo, en exceso resulta muy nocivo para la célula, ya que puede atravesar las membranas biológicas e inducir la formación del radical hidroxilo en puntos alejados de su lugar de origen.

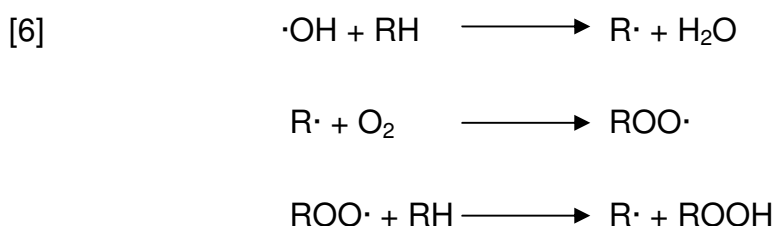
El radical anión superóxido y peróxido de hidrógeno pueden dar lugar al **radical hidroxilo**, si en el medio de reacción existen trazas de metales de transición -como el hierro o el cobre- que actúan como catalizadores aumentando la velocidad de las reacciones hasta 10.000 veces a pH neutro, ya que en disolución acuosa la constante de equilibrio es muy baja (Eltner, 1991) (reacciones [3-5]):



La reacción [4] se conoce como reacción de Fenton, y fue descrita en 1834 para explicar las propiedades oxidantes de la mezcla sulfato ferroso y peróxido de hidrógeno. La reacción [5] es la reacción de Haber-Weiss que fue propuesta en 1934 y demuestra que la reacción entre el radical anión superóxido y el peróxido de hidrógeno da lugar al radical hidroxilo. El radical anión superóxido necesita la presencia del peróxido de hidrógeno para producir el radical hidroxilo, mientras que el peróxido de hidrógeno puede producirlo por sí mismo.

Por tanto, es muy importante eliminar rápidamente las especies reactivas de oxígeno como el radical anión superóxido y el peróxido de hidrógeno de la célula, de ahí la existencia de los correspondientes mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos -SOD y catalasa-, antes de que formen el radical hidroxilo, altamente oxidante, y contra el que no existe ningún sistema detoxificador enzimático.

El radical hidroxilo está implicado en las reacciones del proceso de peroxidación lipídica con los ácidos grasos no saturados (RH), generando radicales alquilo ($R\cdot$), radicales peroxilo ($ROO\cdot$) e hidroperóxidos ($ROOH$) estables, según las reacciones siguientes (reacciones [6]):



Los radicales peroxilos son capaces de llevar a cabo reacciones de terminación con la formación de productos excitados electrónicamente, como el oxígeno singlete (1O_2), aldehídos (ROH) y cetonas (RCO^*) con grupos carbonilos excitados (reacciones [7]); (Cascales, 1999).



1.2. Fuentes de especies reactivas de oxígeno

Además de la radiación ultravioleta, que produce radicales libres como el oxígeno singlete, existen varios sistemas enzimáticos en distintos compartimentos celulares que generan radicales libres.

Las **mitocondrias**, presentes en todas las células aerobias, son la fuente biológica más importante de anión superóxido llevada a cabo por dos componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, la ubisemiquinona y la flavin semiquinona de la NADH deshidrogenasa. El radical anión superóxido no es capaz de atravesar la membrana mitocondrial interna por lo que se encuentra confinado en la matriz donde reacciona rápidamente con la enzima manganeso-superóxido dismutasa (Mn-SOD) y con el óxido nítrico dando lugar al peróxido de hidrógeno y al peroxinitrito, respectivamente (Lezza y cols., 1994).

En la **membrana** celular se generan radicales anión superóxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y ácido hipocloroso (HClO) mediante la acción de las enzimas NAD(P)H oxidasa, mieloperoxidasa y xantina oxidasa (Wolin, 2000; Genestra, 2007). Además, otras enzimas como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa también generan ROS durante la síntesis de leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas (Wolin, 2000; Genestra, 2007).

En el **retículo endoplasmático** también se producen radicales anión superóxido y peróxido de hidrógeno por la autooxidación de la flavoproteína NADPH citocromo P-450 reductasa y el citocromo P-450. Asimismo, las

monooxigenasas de función mixta, proporcionan otra fuente importante de anión superóxido (Kozlov y cols., 2007).

En el **citoplasma** se encuentran enzimas como la xantina oxidasa y la aldehído deshidrogenasa que durante sus ciclos catalíticos generan ROS como subproductos (Greene y Paller, 1992), y pequeñas moléculas solubles, como catecolaminas, flavinas y tioles, que mediante procesos de autooxidación reducen el oxígeno (Baccanari, 1978).

2. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las especies reactivas de oxígeno cumplen importantes funciones celulares, de hecho se están produciendo continuamente en el organismo y muchas de ellas son necesarias para llevar a cabo varios procesos biológicos (Suzuki y cols., 1997; Turpaev, 2002; Hancock y cols., 2001; Valko y cols., 2007). Entre otras, las ROS llevan a cabo funciones defensivas, como la actividad fagocítica, el ataque a virus, bacterias y células anómalas (Suthanthiran, 1984; Donkó y cols., 2005). Asimismo, actúan como vasodilatadores en la circulación cerebral (Miller y cols., 2006; Terashvili y cols., 2006). Las ROS también regulan diversas actividades enzimáticas, participan en sistemas de transducción de señales y pueden actuar como segundos mensajeros (Nose, 2000; Dröge, 2002; Turpaev, 2002; Galaris y Pantopoulos, 2008; de Lamirande E y O'Flaherty, 2008). Además, intervienen tanto en la diferenciación celular como en los procesos de apoptosis (Suzuki y cols., 1997; Ozben, 2007; Chen y cols., 2008).

3. EFECTOS NOCIVOS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La acumulación de ROS en el organismo puede provocar daños en la estructura y función celular mediante la degradación oxidativa de los lípidos, las proteínas y el ADN (Finkel, 2003; Cui y cols., 2004; Liu y cols., 2005; Dröge y Schipper, 2007).

Peroxidación lipídica

Los lípidos, sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son las biomoléculas más susceptibles de ser atacadas por los radicales libres (Cheesman y Slater, 1993). La peroxidación lipídica es un proceso en el que se producen lesiones en las membranas biológicas lo que conlleva daños celulares irreversibles (Halliwell y Gutteridge, 1984; Korkmaz y cols., 2006; Nicolson, 2007, Casado y cols., 2008; Zimniak, 2008).

La peroxidación lipídica consta de tres fases: fase de iniciación, fase de propagación y fase de terminación (Mathews y cols., 1999).

La **fase de iniciación** comienza con el ataque de un radical hidroxilo a un ácido graso poliinsaturado (RH), formándose un radical alquilo ($R\cdot$). Este radical alquilo es un dieno conjugado que reacciona con el oxígeno molecular dando lugar a un radical peroxilo ($ROO\cdot$), compuesto principal de la peroxidación lipídica (Aikens y Dix, 1991; Hogg y Kallagan., 1999) (secuencia de reacciones [8]).

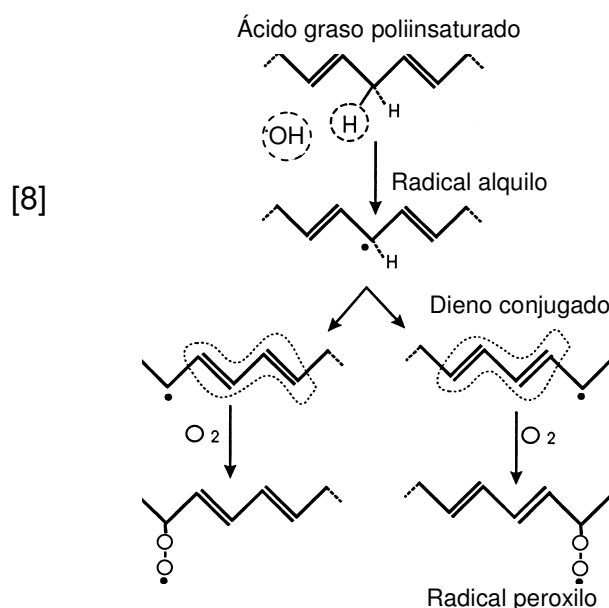
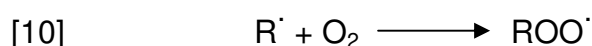


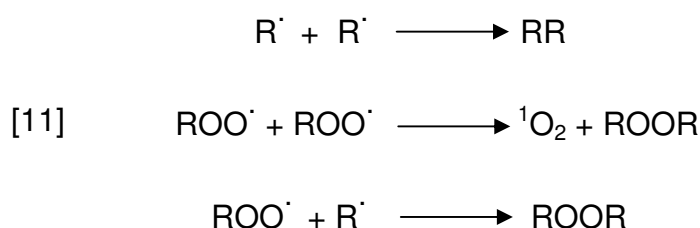
Figura 3. Fase de iniciación de la peroxidación lipídica. Adaptado de Hogg y Kalyanaraman, 1999.

A continuación, en la **fase de propagación**, el radical peroxilo reacciona con un ácido poliinsaturado, formándose el hidroperóxido (ROOH) (Bielski y cols., 1983) y otro radical alquilo, que este a su vez dará lugar a otro radical peroxilo (reacciones [9] y [10]). Los hidroperóxidos formados en esta fase inducen a su vez daño oxidativo (Girotti, 2008).



La **fase de terminación** se produce cuando reaccionan dos radicales dando lugar a compuestos no radicales (secuencia de reacciones [11]). El oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) que se genera en esta fase también puede reaccionar con

un ácido graso poliinsaturado y desencadenar un nuevo proceso de peroxidación lipídica (Minami y cols., 2008). En esta fase también se producen hidroperóxidos, F2-isoprostanos y aldehídos (como el 4-hidroxinonenal o el malonaldehído). Algunos de estos aldehídos son muy reactivos y se pueden considerar como segundos mensajeros que aumentan la toxicidad de la peroxidación lipídica (Esterbauer y cols., 1991; Moore y cols., 1995; Guiotto y cols., 2007).



Daño a proteínas

Todas las proteínas tienen residuos susceptibles de ser afectados por los radicales libres, principalmente por el radical hidroxilo. Los aminoácidos tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína, son los más susceptibles de ser oxidados, perdiéndose su función biológica (Davies, 1987). En situaciones de estrés oxidativo, los radicales libres provocan daños en las proteínas, modificando sus componentes. Estas modificaciones en las proteínas, que pueden ser catalizadas por iones metálicos, producen la pérdida de la actividad catalítica o de la integridad estructural de la membrana (Shacter, 2000; Nyström, 2003; Breusing y Grune, 2008; Winterbourn y Hampton, 2008). Por otra parte, las proteínas modificadas pueden formar compuestos covalentes entre proteínas o aductos con otros radicales (como los que se generan durante la peroxidación lipídica) (Kowalik-Jankowska y cols., 2008; Winterbourn y Hampton, 2008).

Las proteínas que contienen los aminoácidos cisteína y metionina, son más propensas a sufrir daño oxidativo por contener átomos de azufre que son susceptibles a la oxidación (Levine y cols., 1999; Shacter, 2000; Brown y cols., 2008), aunque el papel de la metionina no está claro ya que podría proteger a las proteínas del daño oxidativo (Levine y cols., 1999).

Daño al ADN

Los radicales libres pueden producir daño al ADN provocando la rotura de las cadenas polipeptídicas, por hidroxilación de sus bases nitrogenadas, provocando uniones cruzadas entre las distintas cadenas del ADN o entre las cadenas de ADN y las proteínas, o modificando la cromatina. El radical hidroxilo es el inductor de las roturas de las cadenas de ADN. También es responsable de la formación de las bases anómalas, así como de alteraciones en la duplicación y transcripción (Floyd y Carney, 1992; Meissner, 2007).

4. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

La mayor parte de los radicales libres generados por el organismo son eliminados mediante unos mecanismos de defensa -presentes en todas las células- conocidos como antioxidantes, captadores de radicales libres o reductores. Un antioxidante se puede definir como una sustancia que, a bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, retrasa o previene su oxidación (Halliwell y Whiteman, 2004). Los antioxidantes pueden ser generados por las propias células o incorporados en la dieta. Los sistemas de defensa antioxidante en el organismo pueden clasificarse en dos grupos: sistemas de defensa enzimáticos y sistemas de defensa no enzimáticos. Los sistemas enzimáticos se encuentran dentro de la célula como la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR), la SOD, y la catalasa. Además de los sistemas enzimáticos existen pequeñas moléculas en los espacios extracelulares, en la sangre, así como en los fluidos corporales, que

constituyen una primera línea de defensa frente a ROS, donde los sistemas enzimáticos están ausentes o en cantidades muy pequeñas. Estas pequeñas moléculas antioxidantes pueden ser hidrosolubles, localizadas en los fluidos, como el glutatión o la vitamina C, o liposolubles, localizadas en las membranas celulares, como la vitamina E (Dekkers y cols., 1996).

4.1. Sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos

Glutatión

El glutatión es un péptido compuesto por tres aminoácidos: γ -L-glutamina, L-cisteína y glicina. El glutatión es el mayor componente sulfhidrilo no proteico en las células de mamíferos, presente a concentraciones de 0,5 a 10 mM (Meister y Anderson, 1983; Biolo y cols., 2007). Este tiol libre tiene importantes funciones biológicas: en la proliferación celular, en el transporte de aminoácidos, en la síntesis de proteínas y de ADN, como reserva para la cisteína y en la protección celular contra la oxidación (Meister y Anderson, 1983; Franco y cols., 2007). Esta protección frente al daño causado por sustancias oxidantes como los radicales libres, se debe al grupo sulfhidrilo (SH) de la L-cisteína (Meister y Anderson, 1983) (Figura 4).

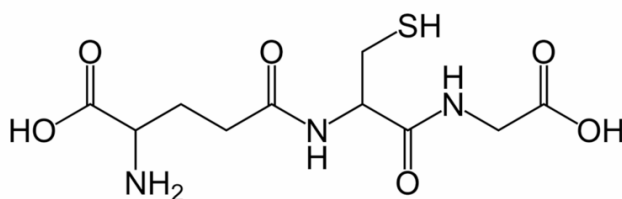


Figura 4. Estructura química del glutatión en forma reducida (GSH).

El glutatión puede encontrarse en dos formas redox: el glutatión reducido (GSH) y el glutatión oxidado (GSSG). El GSSG está formado por dos GSH unidos por un puente disulfuro. El glutatión se puede considerar como un tampón redox,

protegiendo los grupos sulfhidrilo de las proteínas, manteniendo el hierro del grupo hemo en forma de hierro (II) y eliminando los peróxidos tóxicos. El paso de la GSH a GSSG está catalizado por la glutatión peroxidasa. El GSSG se encuentra a concentraciones mucho menores que el GSH, inferiores al 5%. En condiciones fisiológicas normales el equilibrio entre el GSSG y el GSH se mantiene a través de un rápido reciclaje del GSSG a GSH por la glutatión reductasa, flavoenzima que utiliza el NADPH como donador de electrones (Meister y Anderson, 1983). Durante las reacciones catalizadas por la GPx y la GR, el glutatión no se consume, se recicla (Figura 5).

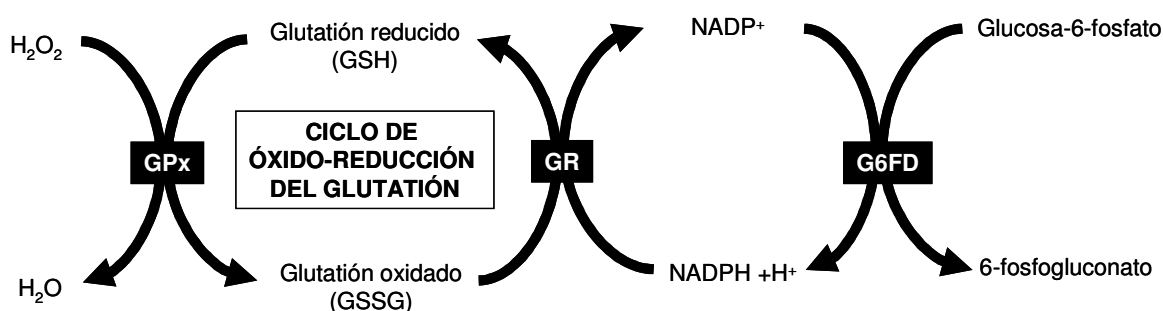


Figura 5. Ciclo de óxido-reducción del glutatión. GPx: glutatión peroxidasa, GR, glutatión reductasa, G6FD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

En situaciones de estrés oxidativo, el GSH elimina el exceso de radicales libres intracelulares y por oxidación del grupo sulfhidrilo de su residuo cisteína, se oxida a GSSG mediante la glutatión peroxidasa, que posteriormente se reduce a GSH por la glutatión reductasa (Meister y Anderson, 1983; Shan y cols., 1990), pero puede producirse una acumulación de GSSG con efectos tóxicos como por ejemplo inactivando enzimas. Para evitar estos efectos, las células han de mantener el cociente GSSG/GSH dentro de unos límites bajos (menores a 0,01). Por tanto, el contenido de GSSG intracelular es un buen índice de estrés oxidativo.

Vitamina C o ácido ascórbico

Las propiedades antioxidantes del ácido ascórbico se atribuyen a la capacidad de su forma ionizada para reaccionar con los radicales libres y para regenerar la vitamina E (Stadtman, 1991). En el proceso de regeneración de la vitamina E, se forma el radical semidehidroascorbato, que presenta una baja reactividad (Bielski y cols., 1975) y se descompone espontáneamente -con lo que frena las reacciones en cadena de los radicales- o se reduce de nuevo para regenerar el ascorbato con consumo de NADH o glutatión (Halliwell, 1990). Sin embargo, el ascorbato también es capaz de reducir el hierro (III) a hierro (II) y el oxígeno a peróxido de hidrógeno, favoreciendo la reacción de Fenton, aunque en condiciones fisiológicas se ha demostrado que el ascorbato ejerce un efecto inhibitor sobre la peroxidación lipídica y la oxidación proteica (Hunt y cols., 1992).

Ácido úrico

El ácido úrico es un antioxidante hidrosoluble capaz de eliminar radicales libres y trazas de hierro (II) (Davies y cols., 1986), aunque hay controversia respecto a sus propiedades antioxidantes, ya que podría llegar a tener efectos pro-oxidantes y pro-inflamatorios cuando hay un exceso de ROS (Strazzullo y Puig, 2007).

Vitamina E o tocoferol

La vitamina E es un antioxidante liposoluble que puede eliminar radicales libres e inhibir procesos de peroxidación lipídica de las membranas (Atkinson y cols., 2008). Este bloqueo se produce porque el radical lipoperoxilo, en vez de atacar a un segundo lípido insaturado, reacciona con el hidroxilo fenólico de la vitamina E, produciendo un lipoperoxido y un radical de la vitamina E, el radical tocoferilo. Las formas resonantes del radical de la vitamina E no son suficientemente reactivas para seguir propagando la peroxidación.

Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos orgánicos constituyentes de las membranas de los cloroplastos, constituyendo las especies químicas más eficientes para atrapar el oxígeno singlete (Bensasson y cols., 1976). Presentan acciones sinérgicas con la vitamina E. Pero mientras los carotenoides actúan en presencia de bajas presiones de oxígeno, la vitamina E lo hace a valores elevados (Di Mascio y cols., 1991). Asimismo, la vitamina E protege de la oxidación a los dobles enlaces conjugados de los carotenos (Burton e Ingold, 1984; Huang y cols., 2006).

Melatonina

La melatonina es una hormona implicada en el proceso de madurez sexual, en la respuesta inmune, regula la temperatura corporal y actúa como uno de los antioxidantes liposolubles más eficaces frente al radical hidroxilo (Pieri y cols., 1995). Además, modula la óxido nítrico sintasa (NOS), los enzimas generadores de radicales libres dependientes del citocromo P-450 y estimula la glutatión peroxidasa (Barlow-Walden y cols., 1995).

Ubiquinol o coenzima Q

El ubiquinol o coenzima Q es un antioxidante liposoluble, que difunde rápidamente a través de la membrana mitocondrial interna y es un constituyente de la cadena de transporte de electrones, con capacidad para estabilizar membranas por inhibir la peroxidación lipídica. Estos efectos se producen gracias a la capacidad de la forma reducida del ubiquinol –ubiquinol QH₂– para eliminar radicales libres (Alleva y cols., 1995; Cascales, 1999). El ubiquinol QH₂ es un antioxidante natural, y al contrario que la vitamina E o los carotenoides, su actividad antioxidante es ilimitada (Cascales, 1999).

4.2. Sistemas de defensa antioxidante enzimáticos

A continuación se describen diversos enzimas que participan en la protección de las células frente a las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la protección eficiente frente al estrés oxidativo ha de ser proporcionada por la coordinación adecuada entre todas las enzimas y demás sistemas antioxidantes de la célula.

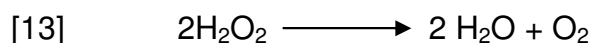
Superóxido dismutasa

La enzima superóxido dismutasa constituye la primera defensa enzimática que presenta la célula frente a la producción de radical anión superóxido. Esta enzima cataliza la dismutación del radical anión superóxido para dar como productos finales peróxido de hidrógeno y oxígeno (ver reacción [2]).

Desde su descripción en 1969 por McCord y Fridovich, se han caracterizado tres isoenzimas en mamíferos que difieren tanto en su localización celular como en los cofactores metálicos de sus centros activos. La enzima SOD de localización citosólica es la Cu/Zn-SOD; la SOD localizada en la matriz mitocondrial es la Mn-SOD (Fridovich, 1974 y 1975; McCord y Fridovich, 1988), y se ha descrito una tercera isoforma, la EC-SOD, que se localiza en el espacio extracelular (Nozik-Grayck y cols., 2005; Szasz y cols., 2007).

Catalasa

La catalasa es otro sistema de defensa antioxidante complementario con la SOD, ya que elimina el peróxido de hidrógeno celular cuando se encuentra a una concentración más elevada de lo normal para transformarlo en oxígeno y agua (reacción [13]):



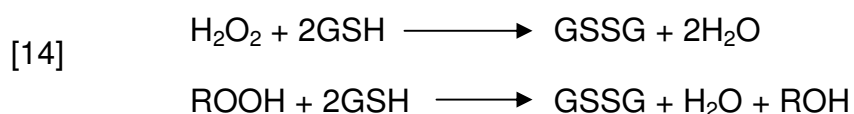
Es una hemoproteína que consta de cuatro subunidades proteicas, cada una de las cuales contiene un grupo hemo [hierro (III)-protoporfirina] unido a su centro activo.

La catalasa se encuentra en diversos tejidos como el hígado, riñón y en menor cantidad en el tejido conectivo y eritrocitos (Aebi, 1984). Asimismo, la catalasa también está presente en tejido vascular (Szasz y cols., 2007).

Glutación peroxidasas, glutación reductasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

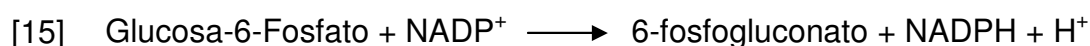
La catalasa y la glutación peroxidasa desempeñan papeles complementarios ya que este último enzima elimina cantidades de hidroperóxidos bajas pero producidas constantemente, mientras que la catalasa es de gran importancia en situaciones de estrés oxidativo debido a que presenta valores de K_m y V_{max} casi tres órdenes de magnitud mayores que los de la glutación peroxidasa (Amstad y cols., 1994).

La glutación peroxidasa se localiza fundamentalmente en el citoplasma, aunque también puede encontrarse en la mitocondria. Se localiza tanto en eritrocitos como en plasma. La GPx desempeña un papel fundamental en la defensa antioxidante contra el estrés oxidativo protegiendo las membranas frente a la peroxidación lipídica (Sevanian y cols., 1988; Howard, 1998; Groussard y cols., 2003) mediante la destrucción, por reducción, del peróxido de hidrógeno y de los hidroperóxidos orgánicos, a la vez que oxida el GSH a GSSG (reacción [14]).



El GSH consumido por la GPx se regenera a través de la glutatión reductasa (Figura 5). Esta enzima es fundamental para la correcta eliminación de hidroperóxidos y para proteger al organismo del daño producido por el GSSG. La GR es una flavoenzima que se encuentra en citoplasma y mitocondrias, encargada de mantener los niveles normales de glutatión intracelular, ya que la disponibilidad del GSH es limitada, y un aumento en la relación GSSG/ GSH, es altamente tóxica para la célula.

El NADPH oxidado por la glutatión reductasa es reducido de nuevo por la glucosa 6-fosfato deshidrogenada (Rahman y cols., 1999) (reacción [15]).



III. HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre bombeada por el corazón sobre las arterias. La hipertensión arterial (HTA) es el aumento de la presión o tensión arterial por encima de unos valores normales. Puesto que la presión arterial tiene una distribución unimodal (Oldham y cols., 1960), la palabra hipertensión es en cierto modo científicamente cuestionable ya que su clasificación –basada en valores de corte- es arbitraria. Sin embargo la existencia de valores de corte por encima de los cuales se considera que un individuo es hipertenso, son necesarios, ya que la HTA es un importante factor de riesgo de patología cardiovascular y el conocimiento de las cifras de presión arterial son esenciales para el abordaje terapéutico y para la práctica clínica diaria (Mancia y cols., 2007).

La hipertensión arterial puede clasificarse en hipertensión primaria o esencial e hipertensión secundaria. La hipertensión esencial es de origen desconocido. Es el tipo de hipertensión más común en la población y la padecen, aproximadamente, un 95% de los pacientes hipertensos. La hipertensión esencial

humana se desarrolla de manera gradual, generalmente a partir de la mediana edad aunque también puede comenzar a edades más tempranas (Staessen y cols., 2003). Aunque la HTA esencial es de origen desconocido existen diversos aspectos fisiopatológicos conocidos. Entre otros está claramente establecido el papel central que ocupa la disfunción endotelial (Swales, 1995) y el remodelado de la pared de las arterias de resistencia (Folkow, 1990; Mulvany, 1994). También son conocidos algunos factores que contribuyen al desarrollo y mantenimiento de la HTA. Unos son factores modificables tales como la dieta (especialmente el exceso en el consumo de sal) o el sedentarismo (Bohr y cols., 1991; Swales 1995; Hanes y cols., 1996). Otros son factores no modificables, como: la carga genética; la raza -la presión arterial presenta valores más elevados en personas de raza negra que en personas de raza blanca- (Burt y cols., 1995); el género -los hombres tienen mayor riesgo de ser hipertensos hasta los 55 años, a partir de entonces, el riesgo es el mismo para hombres y mujeres-; o la edad -la presión arterial aumenta con la edad- (Swales, 1995). También se conoce que el desarrollo de la hipertensión esencial suele estar asociado a otras alteraciones como la obesidad, la Diabetes Mellitus y la hipercolesterolemia, las cuales forman parte de lo que se denomina *síndrome metabólico* y que junto con la hipertensión, constituyen importantes factores de riesgo de desarrollo de accidentes cardiovasculares (Mancia y cols., 2007; Wassink y cols., 2007).

La hipertensión secundaria tiene una etiología conocida y la padecen el 5% de los pacientes hipertensos. Entre otros orígenes puede deberse a la existencia de enfermedades renales o alteraciones de las arterias renales; a un estrechamiento de la arteria aorta; a anomalías en la secreción de diversas hormonas (como las producidas por las glándulas suprarrenales o el tiroides, entre otras). Una vez conocida la causa de la hipertensión y habiéndose tratado al paciente, la presión arterial retorna a sus valores normales (Mancia y cols., 2007).

Cuando se produce un exceso de presión en las arterias que es mantenido a lo largo del tiempo, puede llevar a un gran número de complicaciones. La

hipertensión puede afectar a la salud de diversas maneras. En primer lugar la presión dentro de las arterias puede producir un endurecimiento de las arterias, hipertrofia de la pared vascular o estrechamiento de la luz vascular, todo esto se conoce como remodelado vascular hipertensivo (Safar y cols., 2001; Et-Taouil y cols., 2003; Safar y cols., 2003; Mahmud y Freely, 2004; Schiffrin y Touyz, 2004).

El estrechamiento de la luz vascular, junto con el aumento del riesgo de aterosclerosis, puede favorecer la aparición de un accidente cardio o cerebrovascular. Por otra parte, la hipertensión obliga al corazón a trabajar con más intensidad, lo que a la larga produce la hipertrofia ventricular y alteraciones de las arterias intramiocárdicas (Brilla y cols., 2000; Gagnon y cols., 2004; Levick y cols., 2006), que puede conducir a una insuficiencia cardíaca o infarto. Además, la HTA puede producir lesiones renales y oculares, así como patologías vasculares periféricas (Swales, 1995).

El hecho de que la HTA sea un importante factor de riesgo cardiovascular ha determinado que a lo largo de los años, los valores de presión arterial óptimos establecidos para cada población han disminuido progresivamente a medida que se ha profundizado en el conocimiento y consecuencias de la HTA. Por ejemplo, hasta hace una década aproximadamente, los valores por debajo de los 150 mmHg de presión arterial máxima o sistólica (PAS) y de los 90 mmHg de presión arterial mínima o diastólica (PAD), se consideraban dentro del rango de la normalidad, sin embargo, en la actualidad, esos valores ya se consideran elevados. En el año 2003, las sociedades Europea y Americana de Hipertensión (Chobanian y cols., 2003) propusieron nuevas clasificaciones en las que se incluyen nuevas categorías, como la de presión arterial óptima, normal y normal alta (clasificación de la Sociedad Europea de Hipertensión) o presión arterial normal y pre-hipertensión (clasificación de la Sociedad Americana de Hipertensión) (Tabla 2). También se han establecido grados en la clasificación de la hipertensión: “grado 1 y grado 2”, según la clasificación europea y “estadio 1 y estadio 2”, de acuerdo con la clasificación americana. En el año 2007 se ha

realizado una revisión de dichas cifras por un comité de las Sociedades Europea de Hipertensión y Europea de Cardiología (ESH/ESC) manteniéndose la clasificación de las guías del año 2003 con algunas modificaciones (Mancia y cols., 2007). Entre las consideraciones más importantes se ha decidido no utilizar la terminología americana que engloba presión arterial “normal” y “normal alta”. Entre otras razones se han argumentado: 1) el riesgo cardiovascular de ambos grupos de pacientes no es el mismo y por tanto no deben ser tratados de forma similar y 2) dado el significado negativo del término “hipertensión”, la palabra “prehipertensión” puede causar ansiedad en algunos pacientes. También se hace mención de la importancia de la hipertensión sistólica aislada ($PAS \geq 140$ mm Hg y $PAD < 90$ mm Hg), y la elevación de la presión de pulso.

	Normotensión o HTA controlada			HTA		
	Óptima	Normal	Normal-alta	Grado 1	Grado 2	Grado 3
PAS, mmHg	< 120	120-129	130-139	140-159	160-179	≥ 180
PAD, mmHg	< 80	80-84	85-89	90-99	100-109	≥ 110
	Normal**		Prehipertensión**		Estadio 1*	Estadio 2**

Tabla 2. Clasificación de la hipertensión arterial según los niveles de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) de la población, *según la Guía Europea (*European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee 3, ESH/ESC, J Hypertens. 2003; 21:1011-1053*) y **la Guía Americana (*7^o Joint National Committee, JNC-7; Chobanian y cols. JAMA 2003; 289:2560-2572*).

Otro aspecto importante que resalta la nueva guía es la necesidad de tener en cuenta para el tratamiento, lo que se ha quedado en llamar “riesgo cardiovascular global”. Es decir, tener en cuenta, además de las cifras aisladas de presión arterial, la presencia en el paciente de otros factores de riesgo cardiovascular, puesto que la gran mayoría presentan, además de HTA, dislipidemias, obesidad, tabaquismo, diabetes, entre otros.

1. MODELO ANIMAL DE HIPERTENSIÓN ESENCIAL

Debido a la complejidad de la fisiopatología de la hipertensión, los ensayos en animales de experimentación son muy útiles para investigar factores concretos que puedan participar en el desarrollo o en el mantenimiento de la enfermedad y como instrumento de ensayo de fármacos antihipertensivos. Entre los modelos animales para el estudio de la hipertensión esencial destaca la rata SHR. Esta cepa fue desarrollada por el grupo de Okamoto, mediante la selección y el cruce de ratas de la cepa Wistar Kyoto (WKY) que presentaban una presión arterial elevada (Okamoto y Aoki, 1963). La cepa WKY se estableció en 1971 como control normotenso y también se desarrolló a partir de una colonia WKY a través del cruce entre hermanos (Kurtz y Morris, 1988). La diferencia genética entre la SHR y la WKY es sustancial, comparable a la máxima divergencia que existe entre personas no relacionadas (Doggrell y Brown, 1998).

La rata SHR es un buen modelo de estudio de la hipertensión esencial humana debido a las similitudes que presenta con ésta. Entre ellas destaca: 1) la predisposición genética a una elevada presión arterial sin una etiología concreta, 2) el incremento de la resistencia total periférica (Folkow y cols., 1970; Bund y Lee, 2003) y remodelado de las arterias de resistencia, 3) una respuesta similar al tratamiento con fármacos, 4) hipertrofia cardíaca, entre otras (Dickhout y Lee, 1997). Además, la rata SHR presenta una progresión de las alteraciones hemodinámicas similares a las que se observan en los pacientes hipertensos. Así, presenta una fase de pre-hipertensión, seguida por una fase de desarrollo y un período donde la hipertensión ya está establecida. En las primeras fases de la hipertensión, la rata SHR presenta un incremento del gasto cardíaco sin cambios en la resistencia periférica y en la fase de hipertensión establecida el gasto cardíaco retorna a valores normales incrementándose la resistencia periférica total (Folkow, 1993), de forma similar a lo que sucede en el ser humano (Palatini y Julius, 2004). En la cepa SHR, de la misma manera que en los humanos, existe diferencia de género en el desarrollo de la hipertensión, alcanzándose valores de

presión arterial mayores en ratas macho que en hembras (Iams y Wexler, 1979). Por último, existen similitudes entre la cepa SHR y los pacientes con hipertensión esencial en cuanto a las alteraciones estructurales y funcionales de las arterias y su respuesta al tratamiento farmacológico, por lo que la cepa SHR es una de las más utilizadas para testar nuevas terapias antihipertensivas.

IV. ESTRÉS OXIDATIVO E HIPERTENSIÓN ARTERIAL

El estrés oxidativo está claramente asociado a la patología cardiovascular en general (Madamanchi y cols. 2005; Mueller y cols. 2005), y en particular, existen numerosas evidencias experimentales que apoyan el importante papel que desempeña en la patogénesis de la HTA esencial (Zalba y cols., 2001; Dröge 2002, Touyz, 2004, Fortuño y cols., 2005; como revisiones ver Bradford y cols., 2007; Münzel y cols., 2008; Touyz y Schiffrin, 2008; Schulz y cols., 2008).

1. PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN LA PARED VASCULAR

Tradicionalmente se ha asumido que los macrófagos eran la fuente principal de ROS en la pared vascular. Sin embargo, aunque no hay duda de que estas células juegan un papel importante (Cathcart, 2004), está claramente establecido que todas las células de la pared vascular —endotelio, CML y células de la adventicia— producen ROS en cantidades variables en respuesta a diversos estímulos (Griendling y cols., 2000).

Los sistemas enzimáticos principales que generan anión superóxido y sus derivados en la pared vascular son la NAD(P)H oxidasa, la xantín oxidasa, la NOS, la mieloperoxidasa. Asimismo, otros sistemas enzimáticos como la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa hemoxigenasa y el citocromo P-450 pueden generar ROS. Finalmente también puede producirse ROS por la cadena de

transporte electrónico mitocondrial y salida al citoplasma (Touyz, 2005). La importancia relativa de cada uno de estos sistemas va a depender del estado fisiológico o patológico de la pared vascular.

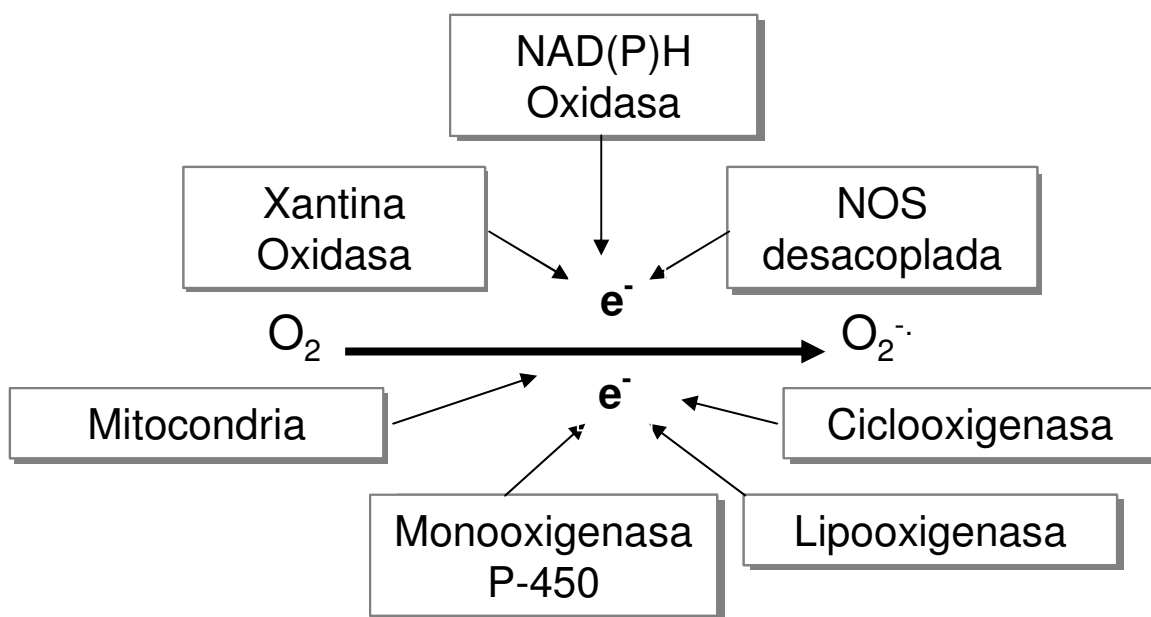


Figura 6. Fuentes enzimáticas de producción de radical anión superóxido. (Adaptado de Paravicini y Touyz, 2008)

NAD(P)H oxidasa

Uno de los principales generadores de radicales anión superóxido es el complejo NADH/NAD(P)H oxidasa que se encuentra unido a la membrana de las células endoteliales, CML y fibroblastos (Touyz y cols., 2002; Lassegue y Clempus, 2003). Este complejo cataliza la reducción del oxígeno molecular usando NAD(P)H como donante de electrones y generando radical anión superóxido. Esta enzima es una proteína multimérica con varias subunidades. La subunidad catalítica que transfiere los electrones es la gp91phox, la Nox1 o la Nox4, la p22phox es una subunidad estabilizadora que une la subunidad catalítica a la membrana plasmática, y las p47phox, p67phox y rac1, son subunidades reguladoras. El patrón de expresión de las diversas subunidades varía según las distintas células de la pared vascular y según el calibre de los vasos. En las CML la Nox1, o la Nox4 es la subunidad catalítica del enzima, a diferencia del enzima de la NAD(P)H oxidasa de neutrófilos, en la que la subunidad catalítica es gp91phox (Hanna y cols., 2004). (Figura 7).

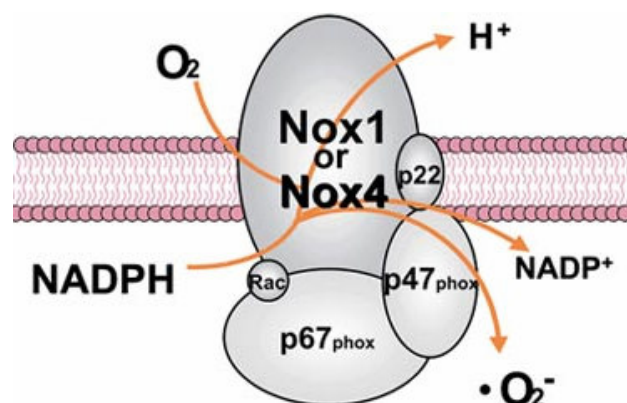


Figura 7. Estructura de la NAD(P)H oxidasa (Dusting y cols., 2005)

La NAD(P)H oxidasa de células fagocíticas, la cual se activa sólo mediante estimulación, produce radical anión superóxido al espacio extracelular de forma

de estallido respiratorio (Babior y cols., 2002; Cascales, 2005). A diferencia de este patrón de activación, las enzimas de la pared vascular están activadas de forma constitutiva, produciendo radical anión superóxido intracelularmente de forma lenta y sostenida, de forma que puede servir como molécula de señalización (Touyz y cols., 2002; Touyz, 2005).

Aunque las NAD(P)H oxidasas vasculares son enzimas constitutivas, se ha demostrado que varios factores humorales, como la Ang II, la ET-1 o el factor de necrosis tumoral (TNF- α) regulan su actividad (De Keulenaer y cols., 1998; Liu y cols., 2003; Pu y cols., 2003; Fortuño y cols., 2005). Por otra parte, la NAD(P)H oxidasa también puede activarse mediante fuerzas hemodinámicas, como el estrés oscilatorio del flujo o la elevación de la presión arterial y consecuente estiramiento de la pared vascular (Ungvari y cols., 2003). Este hecho es de suma importancia en el contexto de la enfermedad cardiovascular en general, y de la hipertensión en particular, en la que se encuentran elevadas algunos de estos estímulos (Mueller y cols., 2005; Touyz, 2005). De hecho se ha demostrado que en la pared vascular la fuente principal de ROS en situación patológica es fundamentalmente la NAD(P)H oxidasa y se conoce que su activación por diversas hormonas, como la ET-1 y la Ang II, así como por estímulos mecánicos participa en el desarrollo de hipertensión (Mueller y cols., 2005; Touyz, 2005). También se conoce que las células fagocíticas de pacientes con HTA responden más a concentraciones fisiológicas de estos factores, y que esta alteración se asocia con una reducción del NO (Fortuño y cols., 2004). Por otra parte, se ha demostrado que las ratas hipertensas por infusión de Ang II o aldosterona presentan niveles elevados de marcadores de estrés oxidativo en asociación con un aumento de la NAD(P)H oxidasa y disfunción endotelial (Virdis y cols., 2002).

Xantina oxidasa

Otra fuente de radical anión superóxido en la pared vascular es la xantina oxidoreductasa. Este enzima es ubiquo y existe en dos formas interconvertibles,

pero con diferente función: la xantina deshidrogenada (XDH; EC 1.1.1.204) y la xantina oxidasa (XO; 1.1.3.22) (Harrison, 2002). Granger y colaboradores demostraron que esta enzima puede participar en la patogénesis de la isquemia-reperfusión (Granger y cols., 1986; Harrison, 2002). Durante la isquemia se produce una elevación de calcio que genera xantina oxidasa a partir de la xantina deshidrogenasa, (que predomina en circunstancias normales *in vivo*). Simultáneamente se genera hipoxantina a partir de ATP. Durante la perfusión la entrada de oxígeno permite la oxidación de la hipoxantina a xantina por la XO para formar radical anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Cai y Harrison, 2000).

Mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima que genera ácido hipocloroso (HClO) y otras moléculas derivadas a partir de peróxido de hidrógeno. Se almacena en neutrófilos y monocitos y recientes evidencias indican que es una de las responsables del daño a la pared vascular en aterosclerosis (Bonomini y cols., 2008). También se ha sugerido que niveles bajos de esta enzima pueden ser protectores de riesgo cardiovascular, mientras que niveles séricos elevados se asocian a aumento de riesgo coronario (Zhang y cols., 2001; Baldus y cols., 2003).

Sintasa de óxido nítrico

El NO se sintetiza a partir de la L-arginina por la enzima NOS presente en las células endoteliales, plaquetas, macrófagos, CML y neuronas (Palmer y Moncada, 1989; Moncada y cols., 1991). Se han descrito tres isoformas de la NOS (NOS I, II y III), también denominadas nNOS, iNOS y eNOS, respectivamente. La nNOS y la eNOS son NOS constitutivas y la iNOS es una enzima inducible que requiere el estímulo por lipopolisacáridos o por citoquinas, induciéndose su síntesis como un

mecanismo de respuesta citotóxico. Las tres isoformas son inhibidas, de manera competitiva, por análogos de la L-arginina, como la N^G-nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME) (Moncada y cols., 1991).

La eNOS es también una tercera fuente de ROS. Una deficiencia en el sustrato, L-arginina, o en alguno de los cofactores del enzima, como la BH₄, está asociada con un desacoplamiento de la vía, lo que produce una reducción de la cantidad de NO y un aumento de la presencia de radicales anión superóxido y peroxinitrito (Landmesser y cols., 2003; Ray y Shah, 2005). Esta situación se produce durante la hipertensión, en la que la activación de la NADPH oxidasa produce oxidación de la BH₄ (Landmesser y cols., 2003; Taniyama y Griendling, 2003; Ray y Shah, 2005).

Además de los sistemas enzimáticos mencionados anteriormente, existen otros enzimas como la lipoxigenasa, ciclooxigenasa, citocromo P-450 monooxigenasa, entre otras, que pueden generar ROS en la pared vascular en ciertas circunstancias (Stocker and Keeney, 2005; Bonomini y cols., 2008). Asimismo, en situaciones patológicas en las que se produce el desacoplamiento de la eNOS, las ROS procedentes de la cadena de transporte mitocondrial pueden salir al citoplasma (Bonomini y cols., 2008; Ray y Shah, 2005).

2. DAÑO PRODUCIDO POR LOS RADICALES LIBRES EN LA PARED VASCULAR

En la pared vascular se localizan fuentes de ROS, siendo el radical anión superóxido uno de los más importantes (Cai y cols 2000; Droge, 2002). Por sí mismo ejerce distintas acciones sobre la pared vascular y, además, es una especie reactiva central en la producción de otros radicales libres de oxígeno y de nitrógeno. Por ejemplo, la reacción de dismutación del radical anión superóxido por la SOD produce peróxido de hidrógeno, un radical libre más estable

(Taniyama y Greiendling, 2003). Éste, a su vez, puede reaccionar con metales de transición reducidos para generar el radical hidroxilo que es altamente reactivo. Por otra parte, puede ser metabolizado por la mieloperoxidasa y generar ácido hipocloroso (HClO), otra especie reactiva. Por último el H_2O_2 puede terminar su acción al convertirse en H_2O por la catalasa y la glutatión peroxidasa.

Una de las acciones deletéreas más importantes del anión suiperóxido en la pared vascular es su reacción con el NO, reduciendo su biodisponibilidad y produciendo peroxinitrito (ONOO-), una especie reactiva de nitrógeno altamente oxidante, que tiene efectos sobre proteínas, ácidos nucleicos y lípidos y causa daño celular (Beckman y Koppenol., 1996).

El NO juega un papel central en la fisiología cardiovascular (Moncada, 1997; Moncada, 1999; Moncada y Higgs, 2006; Moncada, 2006). En primer lugar, el NO es un potente vasodilatador que induce la relajación de las CML mediante la activación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GC), produciendo un aumento del GMPc y una disminución del calcio intracelular Moncada y cols., 1991). El NO es el factor que contribuye en mayor medida a la relajación endotelio-dependiente en las arterias de conducción y musculares, como demuestran experimentos *in vitro*, en los que la inhibición de la NOS produce la vasoconstricción en estos lechos vasculares. Asimismo, cuando los inhibidores se administran *in vivo*, se produce un aumento de la presión arterial sistémica, tanto en animales como en humanos. Además, la administración crónica de L-NAME a ratas induce hipertensión (Arribas y cols., 1997). Esto pone de manifiesto la importancia del NO en la regulación del tono vascular y de la presión arterial (Moncada y cols., 1991; Moncada, 1997, 1999, 2006; Moncada y Higgs, 2006). Por otra parte, el NO es un factor antiproliferativo que inhibe el crecimiento y la migración celular. Adicionalmente, el NO posee propiedades anti-aterogénicas y previene la agregación y adhesión de plaquetas (Sudano y cols., 2006; Pechanova y Simko., 2007).

La importancia del NO en la fisiología cardiovascular hace que entre los efectos deletéreos más importantes del radical anión superóxido esté la disminución de las acciones mediadas por NO, ya que reduce su biodisponibilidad (Puddu y cols., 2000; Lahera y cols., 2003; Higashi y Yoshizumi, 2004). Así, en pacientes con HTA y en algunos modelos animales de hipertensión, se ha descrito que la relajación dependiente de endotelio está reducida por una alteración la vía L-arginina – NO (Luscher y cols., 1990; Panza y cols., 1993; Vanhoutte y Boulanger, 1995). Por otra parte, en individuos con hipertensión esencial se ha detectado una disminución de la cantidad de NO en plasma (Node y cols., 1997). Esto puede deberse a una disminución de la expresión o de la actividad de la NOS que reduzca la producción de NO, tal y como se ha descrito en algunos modelos experimentales de hipertensión (Malinski y cols., 1993; Cuevas y cols., 1996; Chou y cols., 1998). Sin embargo, la biodisponibilidad de NO, además de estar regulada por los niveles de síntesis del factor, está también determinada por su destrucción y por los radicales anión superóxido (Kerr y cols., 1999; Ülker y cols., 2003). De hecho, en situaciones como la hipertensión, en las que se produce estrés oxidativo (Dröge, 2002; Zalba y cols., 2005), la inactivación de NO por ROS parece ser un mecanismo importante. Así, en pacientes hipertensos se ha demostrado que existe una mayor producción de ROS (Taddei y cols., 2001) y menores niveles de SOD (Kumar y Das, 1993). En modelos animales de hipertensión como la rata SHR, también se ha demostrado una mayor producción de radical anión superóxido (Wu y cols., 2001), asociada a una elevación del sistema NADPH oxidasa (Touyz y Schiffrin, 2004; Fortuño y cols., 2004). Las ROS producidos por la pared vascular en situación patológica afectan a otros sistemas productores de factores vasodilatadores, además del NO. Así se ha demostrado que el peroxinitrito desacopla la NOS y la PGI₂ sintasa (Münzel y cols., 2008). Los radicales libres también interfieren en la generación de EDHF, mediante la reducción de la señal eléctrica a través de las conexiones mioendoteliales. Finalmente, se ha descrito que las ROS pueden favorecer la vasoconstricción facilitando la movilización de calcio y el aumento de la sensibilidad al mismo por las proteínas contráctiles (Suzuki y cols., 1995) y

mediante la activación de la maquinaria enzimática que sintetiza EDCFs (Vanhoutte y cols., 2005).

Las ROS, además de reducir la biodisponibilidad de factores endoteliales también producen apoptosis de las células endoteliales, incremento en la adhesión de monocitos y juegan un papel en la angiogénesis (Cai y Harrison., 2000; Taniyama y Grindling, 2003). Aunque la mayoría de los estudios se han centrado en el radical anión superóxido como fuente de alteraciones en el tono vascular, también se ha demostrado que la deficiencia en la GPx produce disfunción endotelial (Forgione y cols., 2002). El hecho de que la GPx participe en la eliminación de los peróxidos de hidrógeno y otros radicales orgánicos, indica que otras ROS, además del radical anión superóxido, participan en el control del tono vascular y pueden estar alteradas en situaciones patológicas (Taniyama y Griending, 2003).

3. TRATAMIENTO ANTIOXIDANTE DE LA HIPERTENSIÓN

La hipertensión está asociada al estrés oxidativo (Kumar y Das, 1993). Este estado puede estar relacionado con un incremento en la producción de radicales libres de la pared vascular, reducción de la biodisponibilidad de óxido nítrico y disfunción endotelial (Kumar y Das, 1993; Panza y cols., 1993). Si el estrés oxidativo juega un papel en la hipertensión y en la disfunción endotelial, se ha sugerido que las terapias antioxidantes pueden ejercer una influencia beneficiosa sobre la presión arterial y sobre la función endotelial (Ward y cols., 2005; Paravicini y Touyz, 2008). De hecho se ha demostrado que la disfunción endotelial que se produce en hipertensión (Laursen y cols., 1997) así como la hipercolesterolemia (Keaney y cols., 1995), mejoran en animales de experimentación tratados con antioxidantes.

Las terapias antioxidantes pueden ser de tipo farmacológico o mediante intervención en la dieta. Entre los fármacos frecuentemente utilizados para el tratamiento de la HTA se ha demostrado que los inhibidores del enzima conversora de angiotensina (IECAs) o los antagonistas de receptores AT1 de AngII (ARAI), no sólo reducen la presión arterial sino que se comportan como antioxidantes (Dohi y cols., 2003; Hamilton y cols., 2004; Ogawa y cols., 2006). Estos efectos han sido atribuidos a la inhibición del efecto de la AngII sobre la NADPH-oxidasas (Touyz, 2005).

En cuanto a los efectos de suplementos con antioxidantes para el tratamiento de la hipertensión existe controversia dado que los resultados no son consistentes (Paravicini y Touyz 2008). La mayoría de los ensayos clínicos realizados con un elevado número de pacientes, para estudiar el efecto de vitaminas antioxidantes para el tratamiento de la hipertensión y de enfermedades cardiovasculares (Jialal y Devaraj, 2003; Hasnain y Mooradian, 2004), en general han sido negativos (Paravicini y Touyz 2008). También han sido negativos en ensayos en los que se utilizaban micronutrientes antioxidantes como suplementos (Ceriello y cols., 2008). Si embargo, en ensayos clínicos con menos pacientes, en los que se estudiaba el efecto de la vitamina C, se ha encontrado una relación inversa entre los niveles de ascorbato (vitamina C) en plasma y la presión arterial (Stephens y cols., 1996; Bates y cols., 1998; Duffy y cols., 1999; Taddei y cols., 1998; Salonen y cols., 2003). Una explicación puede ser que los antioxidantes administrados de forma oral sean inaccesibles a la fuente generadora de radicales libres, particularmente las ROS se generan en compartimentos intracelulares (Cai y cols., 2003). En cuanto a los pacientes incluidos en estos ensayos clínicos se debe tener en cuenta que pueden haber contribuido a estas discrepancias. Una de ellas que la mayoría de los pacientes tenían una enfermedad cardiovascular avanzada, en cuyo caso, los efectos deletéreos del estrés oxidativo pueden ser irreversibles. Por otro lado, estos pacientes estaban tomando aspirina, que ya es antioxidante (Wu y cols., 2002).

A diferencia de los tratamientos con suplementos antioxidantes, cuando se han ensayado dietas antioxidantes, éstas parecen tener efectos más beneficiosos sobre la hipertensión (Ceriello, 2008; Paravicini y Touyz 2008). Así por ejemplo, un elevado consumo de frutas y verduras en la dieta reduce la presión arterial (Appel y cols., 1997), e incrementa la capacidad antioxidante en plasma en individuos normotensos así como en obesos. Una posible explicación es que en estas dietas hay una mezcla de antioxidantes que pueden actuar en cadena de forma más eficiente, mientras que la suplementación con una o más vitaminas no completa ese efecto antioxidante. También se sabe que después de captar un radical libre, si un antioxidante no se recupera por el siguiente paso de la cadena comienza a convertirse en un prooxidante, por lo tanto hay que tomar precaución sobre la utilización de suplementación con determinados micronutrientes (Ceriello, 2008), por ejemplo la vitamina C y E, que en determinadas circunstancias, pueden tener efectos pro-oxidantes (Paravicini y Touyz, 2008).

OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

El Liver Growth Factor (LGF) es un complejo de albúmina-bilirrubina con enlace covalente, que ha demostrado ejercer acciones antihipertensivas en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), mejorando la función y la estructura vascular.

Teniendo en cuenta que:

- La rata SHR presenta estrés oxidativo que se asocia con fibrosis y disfunción endotelial.
- La bilirrubina y la albúmina tienen capacidad antioxidante.

La **hipótesis de trabajo de esta Tesis Doctoral** es que el LGF puede ejercer sus efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular, entre otros, mediante un mecanismo de acción antioxidante.

2. OBJETIVOS

El **objetivo general** es evaluar la capacidad antioxidante del LGF, estudiando: 1) su capacidad para eliminar radicales libres en medio acuoso *in vitro*, y 2) el efecto del tratamiento de ratas SHR con LGF sobre la producción de radical anión superóxido, sobre los niveles de defensa antioxidante endógenos y sobre el daño producido por estrés oxidativo.

Los **objetivos concretos** son:

1. Evaluar la capacidad antioxidante del LGF frente a diversos radicales libres en medio acuoso y comparación con la capacidad antioxidante de sus componentes moleculares –albúmina y bilirrubina-.

2. Evaluar la capacidad del LGF en medio acuoso para proteger al óxido nítrico de la destrucción por el radical anión superóxido en segmentos arteriales.
3. Evaluar el efecto del tratamiento de ratas SHR con LGF sobre la producción de radical anión superóxido, mediante el estudio de:
 - 3.1. La actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa en segmentos arteriales.
 - 3.2. La producción basal de radical anión superóxido en arterias y células musculares lisas.
4. Evaluar el efecto del tratamiento de ratas SHR con LGF sobre el sistema de defensa antioxidante glutatión.
5. Determinar el efecto del tratamiento de ratas SHR con LGF sobre el daño producido por el estrés oxidativo, evaluando:
 - 5.1. El daño a lípidos.
 - 5.2. La biodisponibilidad del NO.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. PURIFICACIÓN DEL LGF

El LGF fue purificado a partir del plasma de ratas parcialmente hepatectomizadas. La extracción, purificación, caracterización y verificación de la actividad del LGF fueron realizadas por el Dr. Díaz-Gil según el procedimiento descrito anteriormente (Díaz-Gil y cols., 1986a; Díaz-Gil y cols., 1994). Antes de usar el LGF, se revisa su actividad *in vivo* a distintas dosis, inyectándolo en ratas normales para establecer la dosis óptima a la que produce la mayor estimulación de síntesis de ADN en hígado, que se determinó por incorporación de ^3H -timidina (New England Nuclear, Dreiech, Germany) en el ADN. Las preparaciones de LGF se liofilizaron y almacenaron a 4°C hasta su uso. Las alícuotas de LGF se reconstituyen en disolución salina estéril.

II. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y TRATAMIENTO

Todos los procedimientos descritos en esta Tesis Doctoral se han realizado de acuerdo con la legislación española para el uso de animales de experimentación (RD 1205/2005) y han sido aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Madrid.

Se utilizaron ratas macho de tres cepas diferentes: Sprague Dawley (SD) de 3 meses de edad, Wistar Kyoto (WKY) de 6 meses de edad y ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de 6 meses de edad. Las ratas WKY y SHR proceden de la colonia Charles River. Todas ellas se criaron en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (Nº de Registro EX/021/U). Los animales permanecieron estabulados en condiciones controladas de temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$) y humedad (44-55%) con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales recibieron dieta sólida estándar (RMN, Harlan Interfauna Ibérica, España) y agua *ad libitum* hasta el momento de ser

utilizados. El día del estudio, las ratas se mataron con una sobredosis de pentobarbital sódico.

Para estudiar los efectos antioxidantes del LGF “*in vivo*” se utilizaron tres grupos experimentales: WKY como control normotenso, SHR como modelo de hipertensión y ratas SHR tratadas con LGF (grupo SHR-LGF). El procedimiento llevado a cabo con las ratas tratadas con LGF fue el siguiente: a cada animal se le administró -por vía intraperitoneal- 4 dosis de LGF distribuidas a lo largo de 9 días (Figura 8). Cada una de las dosis contenía 4,5 µg de LGF liofilizado disueltos en 250 µl de disolución salina estéril. A los animales sin tratar -tanto WKY como SHR- se les inyectó por vía intraperitoneal 250 µl de disolución salina estéril. El día 12 los animales se pesaron y se mataron mediante sobredosis de pentobarbital sódico.

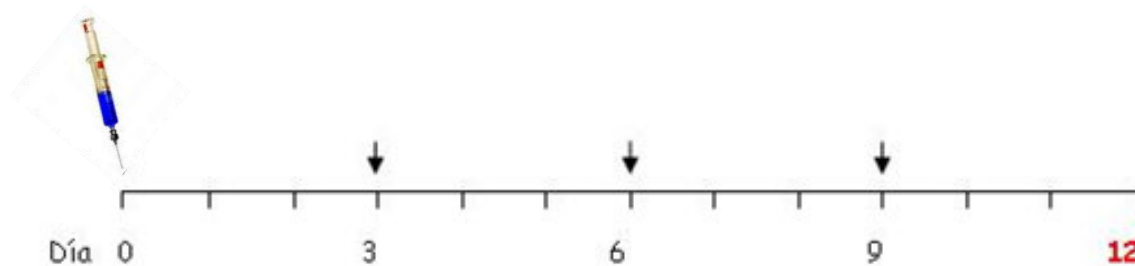


Figura 8. Distribución temporal de la administración de LGF a las ratas SHR y de disolución salina estéril a las WKY y SHR.

III. EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1. OBTENCIÓN DE PLASMA PARA DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

La extracción de las muestras de sangre se realizó en ratas anestesiadas con pentobarbital sódico (Sigma) (50 mg/kg peso) mediante inserción de una cánula en la arteria mesentérica y utilizando heparina como anticoagulante. Para obtener

muestras de plasma, la sangre se centrifugó en tubos eppendorf en una centrífuga a 4°C durante 10 min a 800 g. Posteriormente se recogió el sobrenadante (plasma) y se distribuyó en alícuotas que se almacenaron a -80°C.

2. OBTENCIÓN DE TEJIDO ARTERIAL Y CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS

Los cultivos primarios de células musculares lisas (CML) se obtuvieron de explantes de carótidas de ratas procedentes de las cepas WKY y SHR, así como de ratas SHR tratadas con LGF (SHR-LGF).

Una vez extraídas las arterias se colocaron en una placa con medio de cultivo Dulbecco modificado (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) (Gibco) y suplementado con L-glutamina 1%, penicilina 100 unidades/ml (Sigma), estreptomicina 100 µg/ml (Sigma) y mantenido a 37°C en atmósfera húmeda en incubador de CO₂ al 5 % (tampón regulador de pH 7,4). La luz vascular se limpió perfundiendo medio con una aguja y se eliminaron los restos de tejido conectivo y adiposo que pudieran estar adheridos a la arteria.

Posteriormente, la arteria se troceó en pequeños segmentos que se repartieron en una placa de 6 pocillos con 2 ml/pocillo del medio de cultivo anteriormente descrito y suplementado además con suero bovino fetal 10% (v/v) (Gibco). Las arterias se mantuvieron en el incubador con CO₂ y se cambió el medio cada 3 días, hasta que las células ocuparon toda la superficie del pocillo, aproximadamente al cabo de 3 semanas. Después se eliminó el segmento vascular y las células se recogieron mediante tripsinización. Se inactivó la tripsina (Sigma) con el medio de cultivo y se cogió una alícuota para contar el número de células, con el colorante azul de Tripán (Sigma). Se llevaron 10 µl de la mezcla de células a cada ventana de la cámara de Neubauer, las células muertas se tiñeron de azul y se contaron las células vivas (refringentes) que estaban dentro del área señalada con el recuadro en rojo (Figura 9) y las situadas en el lado superior o

derecho, de cada uno de los cuatro cuadrantes de ambas ventanas de la cámara, mediante un microscopio. Se calculó el número de células con la fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de CML/ml} = \text{promedio del número de células contadas} / (4 \times 10^4)$$

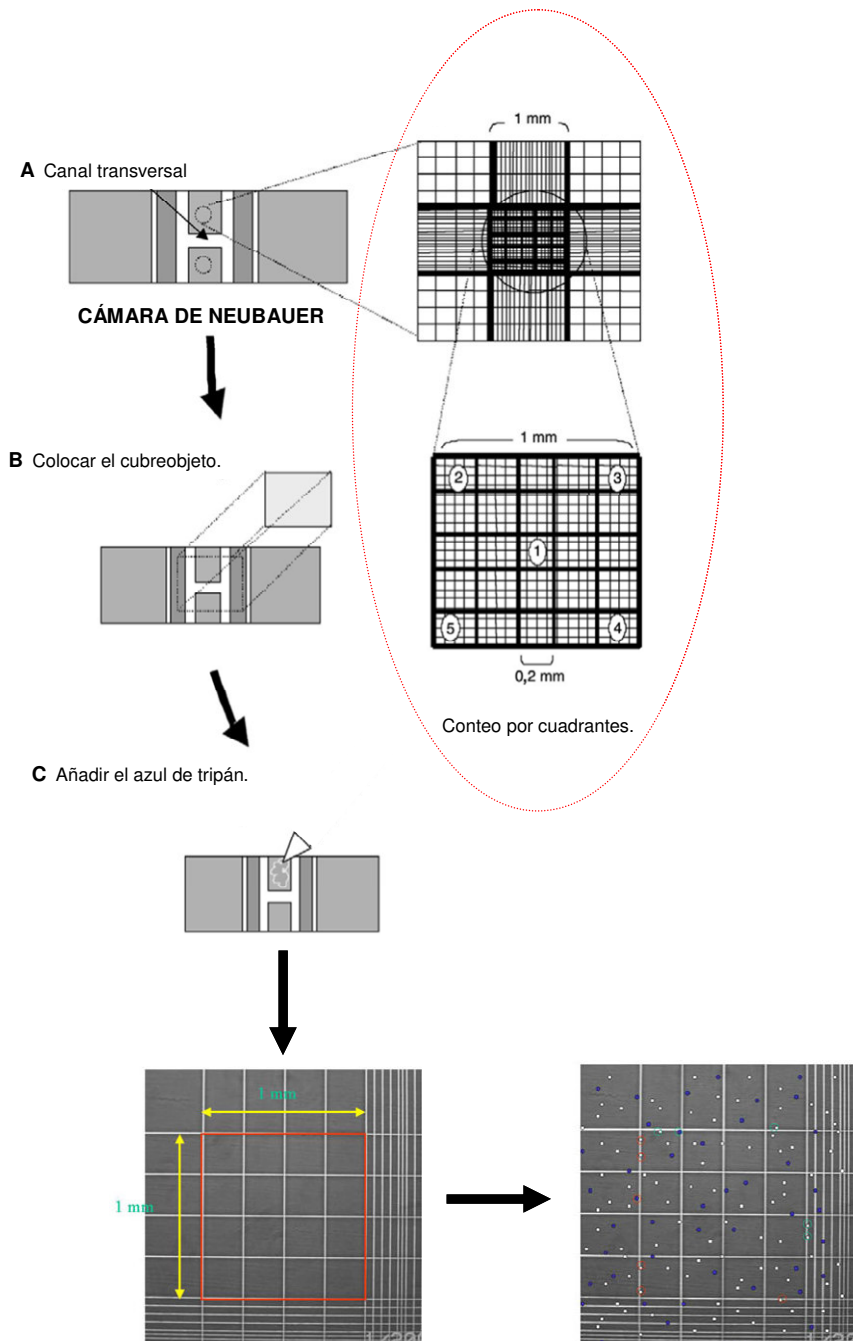


Figura 9. Cámara de Neubauer y esquema del conteo celular.

Las CML se sembraron en placas de 24 pocillos (5000 células por pocillo). Previamente se colocaron cubreobjetos redondos de 6 mm de diámetro, (previamente esterilizados en autoclave) en cada pocillo, para que las células crecieran sobre este soporte. Las células crecieron hasta alcanzar semiconfluencia para realizar los experimentos de producción de radical anión superóxido.

Para caracterizar las células crecidas en los cristales se utilizaron los siguientes anticuerpos (Figura 10):

- Anticuerpo primario anti- α -actina de músculo liso (mouse; dilución 1:200; Bionova). Anticuerpo secundario anti-mouse-FICT (dilución 1:500; excitación 488 nm/emisión 515 nm; Sigma). Sirve para caracterizar las células musculares lisas.
- Anticuerpo primario anti-desmina (goat; dilución 1:100; Santacruz). Anticuerpo secundario anti-goat-TRICT (dilución 1:500; excitación 488nm/emisión 550 nm; Sigma). Sirve para caracterizar las células musculares lisas con fenotipo maduro o contráctil.
- Anticuerpo primario anti-vimentina (mouse; dilución 1:200; Bionova). Anticuerpo secundario anti-mouse-FICT (dilución 1:500; excitación 488nm/emisión 515 nm; Sigma). Sirve para caracterizar fibroblastos o las células musculares lisas que se han dediferenciado.
- Como tinción nuclear se utilizó el DAPI (1:500 de disolución stock 5 mg/ml; Sigma).

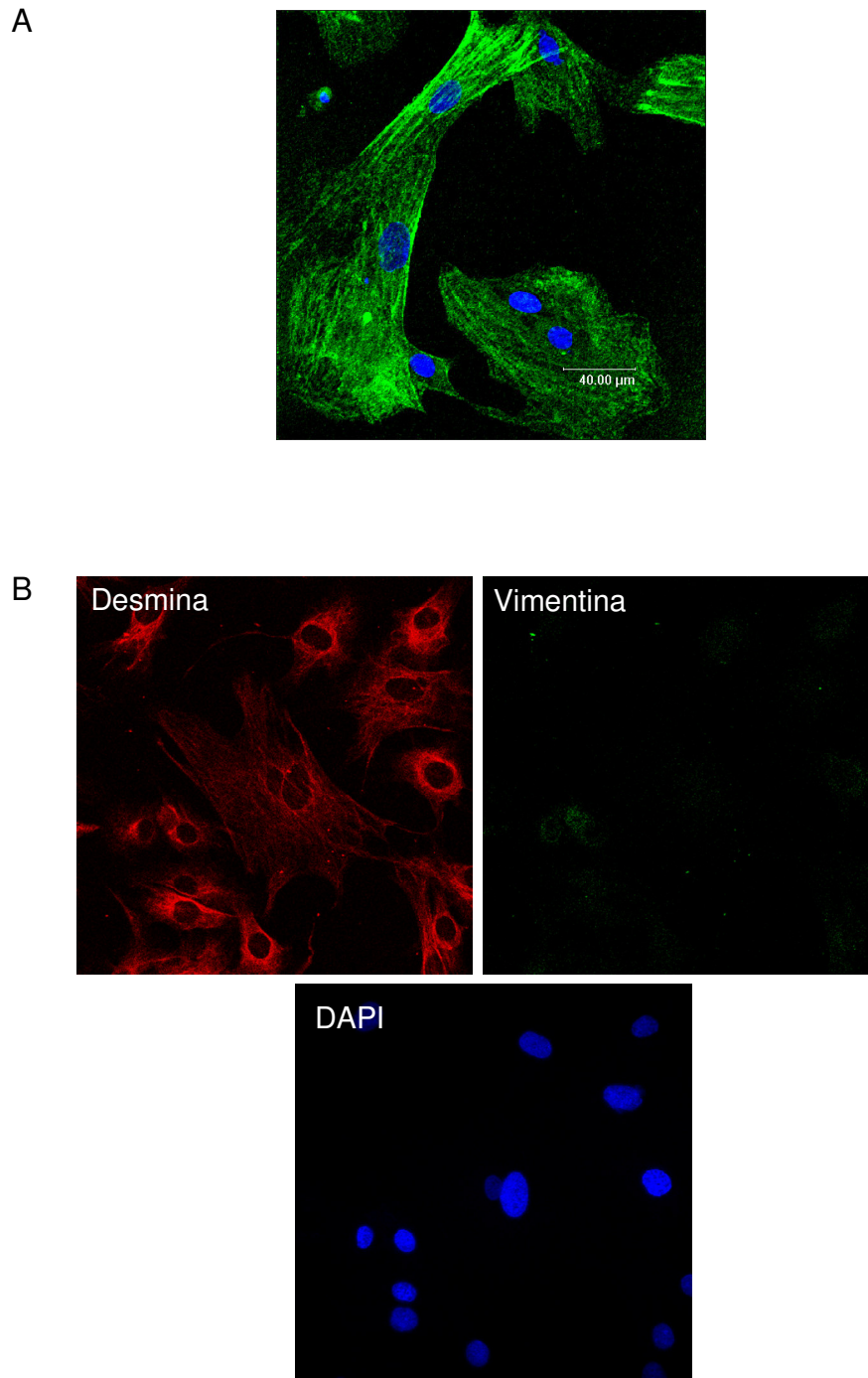


Figura 10. Caracterización de células en cultivo procedentes de arteria carótida de rata. A) Doble tinción con anticuerpo frente a alfa actina (verde) y DAPI (azul). B) Triple tinción frente a desmina (rojo), vimentina (verde) y DAPI (azul). Las imágenes se obtuvieron mediante un microscopio confocal de fluorescencia Leica TCS SP2. Barra= 40 μ m.

IV. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Sigma)
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma)
- Ácido tricloroacético (TCA) (Merck)
- Bilirrubina (Sigma)
- 2-desoxi-D-ribosa (Sigma)
- Dihidrocloreto de 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (AAPH) (Sigma)
- Disolución Krebs Henseleit modificada: NaCl 115 mM (Merck), KCl 4,6 mM (Merck), CaCl₂ 2,5 mM (Merck), NaHCO₃ 25 mM (Merck), KH₂PO₄ 1,2 mM (Merck), MgSO₄ 1,2 mM (Merck), EDTA 0,01 mM (Sigma), glucosa 11 mM (Merck)
- Fluoresceína (Roche)
- LGF (suministrado por el Dr. Díaz-Gil)
- Luminol (Sigma)
- Peróxido de hidrogeno (H₂O₂) (Panreac)
- Persulfato potásico
- Sal disódica del ácido etilendiamin-tetraacético (Na₂-EDTA) (Sigma)
- Seroalbúmina de rata (SAR) (Sigma)
- Sulfato ferroso (FeSO₄) (Sigma)
- Tampón fosfato (KH₂PO₄, K₂HPO₄) (Merck)
- Tampón fosfato salino 0,01 M con NaCl 0,138 M; KCl 0,0027 M; pH 7,4, a 25 °C (PBS)
- Trolox (ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (Sigma)

2. EQUIPOS

- Fluorímetro (Fluoroscanner Ascent, Labsystems)
- Lector de placas (Bio Kinetic Reader EL 340 Microplate, Bio-Tek Instruments)
- Luminómetro (Bacterial Systems, GEM Biomedical Inc.)

3. MÉTODO DEL ABTS

En este método espectrofotométrico se genera el catión radical ABTS mediante la reacción entre el ABTS 7 mM con el persulfato potásico 2,45 mM en medio acuoso e incubación a temperatura ambiente y sin luz durante 16 h. La disolución inicial del catión radical ABTS se diluyó 100 veces con PBS 5 mM, pH= 7,4 hasta una absorbancia de 0,7- 0,8 a 405 nm. Las medidas se pueden hacer a 405 nm o a 735 nm, pero la máxima absorbancia se encuentra a 405 nm de longitud de onda (Re y cols., 1999; Alliaga y Lissi, 2000).

La bilirrubina es liposoluble y para poder utilizarla en los ensayos se requiere que sea hidrosoluble. Para ello se disolvió en medio ligeramente alcalino adicionando NaOH 0,1 M hasta su disolución.

Para determinar la capacidad antioxidante de los distintos compuestos se añadieron 10 µl de LGF (10- 50 ng/µl), bilirrubina (5- 50 ng/µl) o seroalbúmina de rata (SAR) (400- 2400 ng/µl) y rápidamente se adicionaron 200 µl del catión radical de ABTS diluido, agitando 1 min y leyendo posteriormente la absorbancia cada 4 min durante 52 min, a 405 nm en un lector de placas. Como antioxidante de referencia se usó el Trolox -análogo soluble de la vitamina E- y como blanco tampón PBS.

El porcentaje de inhibición del catión radical de ABTS se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición}_{\text{ABTS}^+} = \left[1 - \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \right] \times 100$$

Para calcular la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC), se divide el gradiente de absorbancia del porcentaje de inhibición frente a la concentración de la muestra antioxidante por el gradiente de absorbancia del Trolox.

4. MÉTODO ORAC-FL

Este método fluorimétrico basado en la fluoresceína, sirve para medir la capacidad de captación de radicales peroxilos por un antioxidante potencial. El método ORAC-FL (Cao y cols., 1993; Gomes y cols., 2005; Davalos y cols., 2004) se adaptó a placas de 96 pocillos.

La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato potásico 75 mM, pH= 7,4. Se añadieron 20 µl de LGF (15- 30 ng/µl), bilirrubina (22,5- 50 ng/µl), SAR (22,5- 50 ng/µl) o Trolox (2,5-15 ng/µl) y 150 µl de fluoresceína 100 nM, se agitó 15 s y se incubó 10 min a 37 °C. Después se añadieron rápidamente 30 µl de AAPH 80 mM como generador de radical peroxilo, se agitó a 30 s a 37 °C y se incubó 2 min. A continuación se midió la fluorescencia cada 1,5 min durante 90 min, a $\lambda_{\text{excitación}} = 485 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 538 \text{ nm}$.

La capacidad captadora de radicales peroxilo se calculó hallando el área bajo la curva mediante el método del trapecio con la siguiente ecuación:

$$\text{Área bajo la curva} = \left[0,5 + \sum_1^{60} f_i / f_0 \right] \times 1,5$$

donde f_0 es la fluorescencia inicial y f_i es la fluorescencia a distintos tiempos.

5. MÉTODO DE LA DESOXIRRIBOSA

Se utilizó el método espectrofotométrico de la desoxirribosa modificado para medir la capacidad captadora de radicales hidroxilo de un antioxidante potencial, mediante la formación del aducto MDA-TBA como índice de producción de radicales hidroxilo (Halliwell y cols., 1987). Los radicales hidroxilo se generan por la reacción de Fenton, entre el peróxido de hidrógeno y el hierro (II). La desoxirribosa en presencia de radicales hidroxilo produce MDA.

Se añadieron 150 μ l de una disolución compuesta por tampón fosfato potásico 20 mM, pH= 7,4, FeSO₄ 100 μ M, Na₂- EDTA 104 μ M, H₂O₂ 1 mM, 2-desoxi-D-ribosa 2,8 mM y de los captadores potenciales de radicales hidroxilo: LGF (1,7- 8,3) ng/ μ l, bilirubina (1,7- 8,3 ng/ μ l), SAR (166,7- 833,3 ng/ μ l) o Trolox (0,42 ng/ μ l). La mezcla se incubó 1 h a 37 °C y se paró la reacción mediante la adición de 500 μ l de TCA 30%. Después se añadieron 650 μ l de TBA 0,67% y se incubó la mezcla 1 h a 60 °C en un baño de agua para que se forme el aducto MDA-TBA. Una vez enfriada a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placas. En este ensayo el control positivo es la mezcla sin antioxidante y con 2-desoxi-D-ribosa y el blanco es la mezcla con antioxidante sin 2-desoxi-D-ribosa.

El porcentaje de eliminación de radicales hidroxilo se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de eliminación de radical hidroxilo} = \left[1 - \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{control negativo}}}{A_{\text{control positivo}}} \right] \times 100$$

Y la siguiente ecuación se aplica para calcular la capacidad captadora del LGF y la bilirrubina frente a radicales hidroxilo a ratio constante.

$$\frac{A_o}{A} = 1 + \frac{k_s[S]}{k_{DR}[DR]}$$

Donde: A y A_o son las absorbancias mediadas a 540 nm en presencia y ausencia de captador, respectivamente. [S] y [DR] son la concentración del captador y de la 2-desoxi-D-ribosa, respectivamente.

Por tanto, la representación gráfica de A_o/A frente a [S] debería ser una línea recta de pendiente k_s/(k_{DR}[DR]). La constante de velocidad, k_s, fue calculada mediante la siguiente ecuación: k_s = pendiente x k_{DR} x [DR], siendo k_{DR} [DR] = 3,1 x 10⁹ M⁻¹ s⁻¹ (Halliwell y cols., 1987).

6. MÉTODO DEL LUMINOL

Este método se utiliza para medir la capacidad de un antioxidante para eliminar radicales hidroxilo mediante quimioluminiscencia (Cheng y cols., 2003). La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato potásico 50 mM, pH= 7,4. Se añadieron LGF (14,3 y 23,4 ng/μl) o Trolox (0,12 ng/μl) junto a luminol (0,42 mM), FeSO₄ (2,5 mM), H₂O₂ (0,42 mM), en este orden y se mezclaron. Inmediatamente se midió la quimioluminiscencia con un luminómetro, cada 6 s durante 1,5 min. El blanco de este método es la misma mezcla anterior excepto el H₂O₂.

$$\text{Capacidad antioxidante} = (\text{Promedio Blanco}) - (\text{Promedio Compuesto antioxidante})$$

V. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES BASALES DE RADICAL ANIÓN SUPERÓXIDO Y DE LA ACTIVIDAD NAD(P)H OXIDASA

1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma)
- Difenil iodonio (DPI) (Sigma)
- Dihidroetidio (DHE) (Sigma) se disolvió en DMSO (Panreac) y se conservó en atmósfera inerte con Argón
- Disolución Krebs Henseleit modificada (KHS): NaCl 115 mM (Merck), KCl 4,6 mM (Merck), CaCl_2 2,5 mM (Merck), NaHCO_3 25 mM (Merck), KH_2PO_4 1,2 mM (Merck), MgSO_4 1,2 mM (Merck), EDTA 0,01 mM (Sigma), glucosa 11 mM (Merck)
- Lucigenina (*bis*-N-metilacridona) (Sigma)
- NADH (forma reducida del dinucleótido de nicotinamida adenina) (Sigma)
- Paraformaldehído 4% (Sigma)
- Pirogalol (Sigma)
- ProLong: reactivo que evita la pérdida de fluorescencia (Invitrogen)
- Superóxido dismutasa (SOD) (Sigma)
- Tampón fosfato salino 0,01 M con NaCl 0,138 M; KCl 0,0027 M; pH 7,4, a 25 °C (PBS)
- Tampón HEPES: NaCl 99 mM, KCl 4,7 mM, CaCl_2 1,9 mM, NaHCO_3 25 mM, KH_2PO_4 1,0 mM, MgSO_4 1,2 mM, HEPES 20 mM (Sigma), glucosa 11 mM (pH 7,4)
- Tirón (Sigma)

2. EQUIPOS

- Luminómetro (Bacterial Systems, GEM, Biomedical Incl.)
- Microscopio Confocal Espectral (Leica TCS SP2). Líneas láser: 488 nm/(590-620) nm y 364 nm/461 nm

3. MÉTODO DE LA LUCIGENINA

La producción basal de anión superóxido y de la actividad de la enzima generadora de radicales anión superóxido, la NAD(P)H oxidasa vascular, se evaluó en arterias carótidas de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con LGF (SHR-LGF), mediante un método de quimioluminiscencia en el que se hace el seguimiento de la quimioluminiscencia producida por la lucigenina de acuerdo con el protocolo de Janiszewski y cols., 2002 y Guzik y Chanon, 2005.

Las ratas se mataron mediante inhalación de CO₂. A continuación se extrajeron cuidadosamente las arterias carótidas comunes y se llevaron a una disolución tampón HEPES burbujeada con carbógeno y mantenida a 37° C. Posteriormente se introdujo cada uno de los segmentos vasculares en tubos eppendorf conteniendo 1 ml del tampón HEPES y se estabilizaron 30 min a 37°C, continuamente burbujeados con carbógeno. Algunos segmentos fueron incubados en presencia de DPI 20 µM, inhibidor de la NAD(P)H oxidasa.

Se prepararon tubos de luminómetro con 1 ml de tampón HEPES (con o sin DPI 20 µM), manteniéndose a temperatura ambiente. Asimismo, se prepararon las disoluciones madre de lucigenina, NADH y Tiron, y se guardaron en hielo hasta el momento del experimento.

Tras el periodo de estabilización los tubos con los segmentos arteriales se sacaron del baño y se mantuvieron a temperatura ambiente.

Se programó el luminómetro para test cinético y medición continua durante 5 minutos. Se introdujo el tubo conteniendo 1 ml de HEPES en el luminómetro y se añadió la lucigenina (concentración final 5 µM). Se midió la emisión de luz (en cuantos de luz o fotones) durante 5 minutos, registrándose los cuantos en papel cada 30 segundos (basal sin arteria). A continuación se introdujo el segmento arterial y se repitió la operación, considerándose el sumatorio de los cuantos emitidos (Σ cuantos)

como la emisión basal de anión superóxido por la arteria (basal con arteria). Posteriormente se añadió NADH como sustrato de la enzima NAD(P)H oxidasa y se repitió la operación durante otros 5 minutos, considerándose la emisión de cuantos representativo de la producción de anión superóxido por la actividad estimulada de la enzima (estimulada). Finalmente se añadió Tiron 10 mM como captador de radical anión superóxido permeable a las células. Los segmentos arteriales se secaron y se pesaron (mg) para realizar los cálculos.

Para realizar los cálculos se sumaron todas los cuantos emitidos en cada período de 5 minutos excluyendo el primer dato, correspondiente a los primeros 30 segundos, en los que el sistema aún no se había estabilizado. La producción de anión superóxido en las distintas situaciones se calculó en base a los cuantos o fotones emitidos (medida en unidades relativas de luminiscencia) de la siguiente manera:

$$\text{Medida del } O_2^{\cdot -} = ((\sum \text{ cuantos basales con arteria}) - (\sum \text{ cuantos sin arteria})) / \text{peso}$$

$$\text{Actividad NAD(P)H oxidasa} = ((\sum \text{ cuantos estimulados}) - (\sum \text{ cuantos basales sin arteria})) / \text{peso}$$

$$\text{Medida del } O_2^{\cdot -} \text{ en presencia de Tiron} = ((\sum \text{ cuantos con Tiron}) - (\sum \text{ cuantos basales sin arteria})) / \text{peso}$$

$$\% \text{ Inhibición por Tiron} = 100 - (O_2^{\cdot -} \text{ en presencia de Tiron} / O_2^{\cdot -} \text{ en ausencia de Tiron})$$

4. MÉTODO DEL DIHIDROETIDIO

4.1. Para arterias mesentéricas de resistencia

Para el estudio de la producción basal de radical anión superóxido en arterias se ha utilizado dihidroetidio (DHE). Este producto es capaz de atravesar la membrana de células vivas llegando hasta el citoplasma. En presencia de radical anión superóxido se oxida produciendo bromuro de etidio, que se intercala entre

el ADN del núcleo y emite fluorescencia (longitud de onda de excitación máxima de 490 nm y una emisión en el rango de 590 nm a 620 nm). La fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de radical anión superóxido que llega a las CML y al tiempo de incubación (Suzuki y cols., 1995; Majid y cols 2004). Se ha seguido el protocolo descrito en Arribas y cols., 2007 y González y cols, 2008.

Estudio en arteria mesentérica de resistencia. Se disecó un segmento de arteria mesentérica de resistencia de 3^{er} orden (AMR) de cada animal de los siguientes grupos experimentales: WKY, SHR y SHR-LGF y se conservaron en disolución KHS en frío.

Los segmentos se incubaron durante 30 minutos en una disolución que contenía DHE 3 μ M en la oscuridad en un baño mantenido a 37°C y burbujeado con carbógeno. Para comprobar que la fluorescencia provenía del anión superóxido se realizó un control negativo preincubando con SOD 15U/ml 30 minutos y, posteriormente, añadiendo al medio de incubación el DHE durante otros 30 minutos. Finalmente, los segmentos arteriales fueron fijados durante 45 minutos en paraformaldehído al 4%, para su posterior estudio en un microscopio confocal de fluorescencia (Figura 11).

Para la obtención de imágenes de las AMR, los segmentos se situaron entre un portaobjetos y un cubreobjetos en el que se había colocado un pocillo mediante espaciadores de silicona (Figura 11). Los segmentos arteriales se visualizaron con un objetivo de 40x de aceite (apertura numérica 1,25) con un zum de 2x. Se tomaron secciones ópticas de la arteria a una distancia entre planos de 1 μ m, comenzando en la capa adventicia hasta un total de 25 μ m y se recogió la fluorescencia emitida en la banda de emisión de 590-620 nm. Las condiciones de intensidad de láser, brillo y contraste fueron idénticas para todos los grupos experimentales.

Para la cuantificación de la cantidad de radical anión superóxido se creó una reconstrucción correspondiente a las 25 μm de grosor mediante el programa de análisis de imagen Metamorph. Para la determinación de la producción basal de radical anión superóxido se cuantificaron el número de células positivas para DHE por 25 μm de grosor de la arteria.

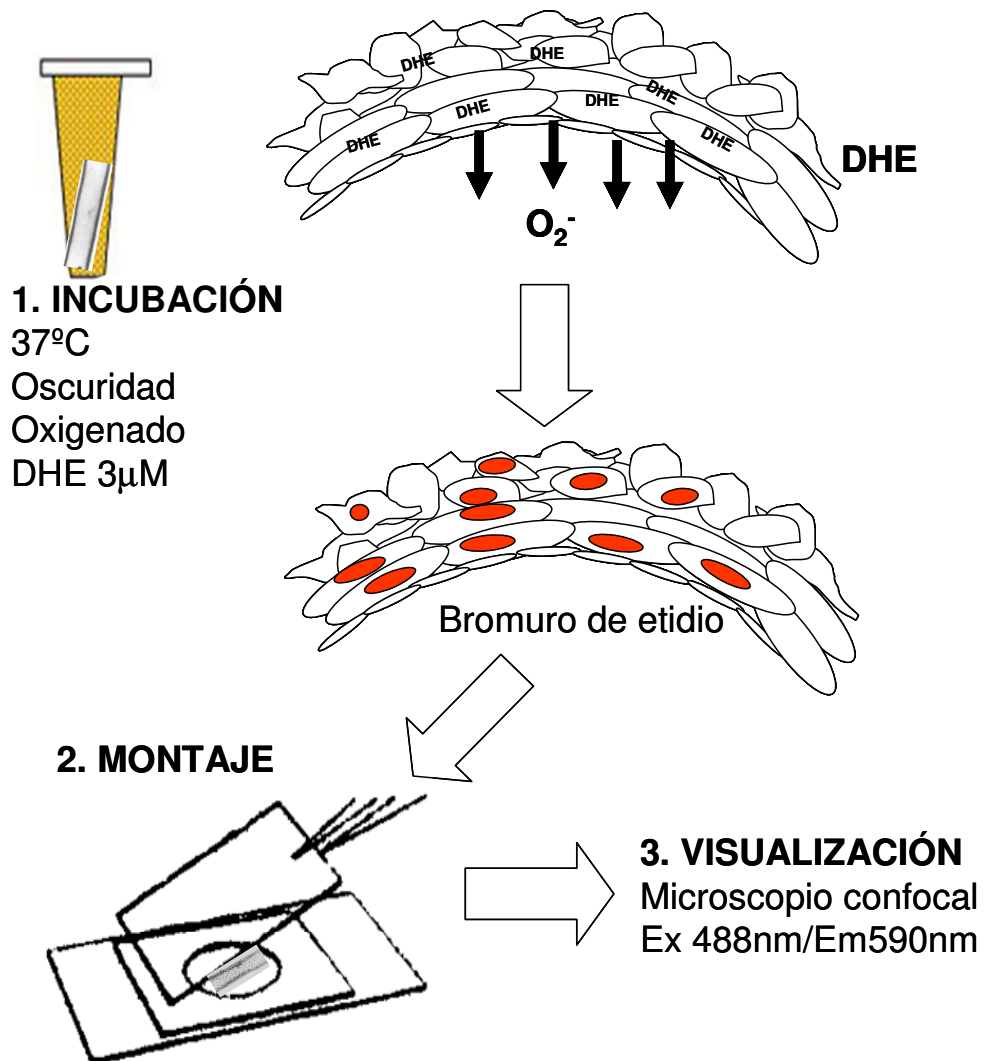


Figura 11. Esquema representativo del método utilizado para la determinación de la producción basal de anión superóxido, basado en la tinción con dihidroetidio (DHE).

4.2. Para células musculares lisas

Para determinar la producción de radical anión superóxido en CML mediante dihidroetidio se utilizaron CML crecidas en cristales estériles procedentes de arterias carótidas de los tres grupos experimentales (WKY, SHR y SHR tratada con LGF). Una vez las células estuvieron en semiconfluencia, se lavaron 3 veces con cuidado con PBS en la campana de cultivos. Posteriormente se añadió PBS conteniendo DHE (3 μ M) y DAPI (1:500) como colorante nuclear y se incubaron en la cámara de cultivos en atmósfera de CO₂ durante 30 min. Las células se lavaron de nuevo 3 veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante otros 30 min a temperatura ambiente en la campana de cultivos.

Los cristales se montaron sobre un portaobjetos en el que se había puesto una gota del medio de montaje Prolong con cuidado de poner los cristales por el lado donde habían crecido las CML y se dejaron secar toda la noche en la oscuridad y a temperatura ambiente.

Los cristales se visualizaron mediante un microscopio confocal de fluorescencia Leica TCS SP2. En primer lugar se utilizó la longitud de onda del DAPI (excitación 364nm/emisión 461nm) con objeto de localizar las células mediante la visualización de sus núcleos y se obtuvo una imagen. A continuación se cambió la longitud de onda para visualizar el DHE (excitación 488nm/emisión 590–620nm) y se obtuvo una segunda imagen. Se realizaron varias adquisiciones de zonas diferentes del cultivo, siempre utilizando el criterio de localización de los núcleos para evitar sesgos. La tinción del DHE se localizó en el citoplasma. Todas las imágenes de los 3 grupos experimentales se adquirieron con objetivos de 20x y 40x y con los mismos parámetros de intensidad de láser, brillo y contraste para poder cuantificar los niveles de intensidad de fluorescencia.

La cuantificación se realizó mediante la medida de la intensidad media de fluorescencia en el área central del citoplasma emitida en la longitud de onda del

DHE. De cada cultivo se calculó el promedio de la intensidad obtenida en varias áreas (imágenes) del cultivo (se midieron como mínimo 5 células/ área de la imagen). Posteriormente se promediaron las intensidades de varios cultivos procedentes de la misma rata.

VI. DETERMINACIÓN DEL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE ENDÓGENO GLUTATIÓN EN PLASMA

1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

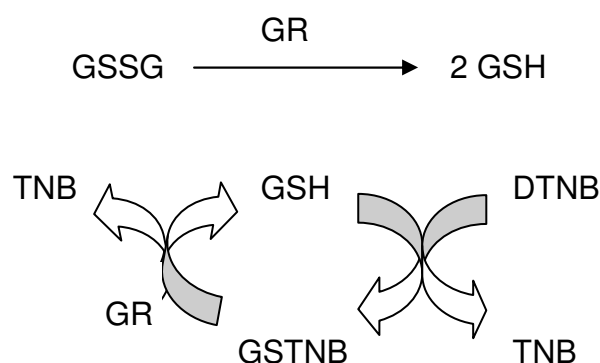
- Ácido bicincónico (BCA) (Sigma)
- Ácido tricloroacético (TCA) (Merck)
- Glutati3n oxidado (GSSG) (Sigma)
- Kit para el ensayo del glutati3n (Cayman)
- Sal dis3dica del 3cido etilendiamin-tetraac3tico ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) (Sigma)
- Sal tetras3dica de β -nicotinamida aden3n di-nucle3tido fosfato (forma reducida) (β -NADPH) (Sigma)
- Seroalb3mina bovina (BSA) (Sigma)
- Tamp3n fosfato (KH_2PO_4 , K_2HPO_4) (Merck)

2. EQUIPOS

- Espectrofot3metro UV-160A, UV-Visible, Shimadzu.
- Lector de placas (Bio Kinetic Reader EL 340 Microplate, Bio-Tek Instruments).

3. MÉTODO DTNB

Se determinó el glutatión total con un kit para el ensayo del glutatión de Cayman. El método optimizado consiste en el reciclado enzimático de la glutatión reductasa (GR) que interviene en la siguiente reacción:



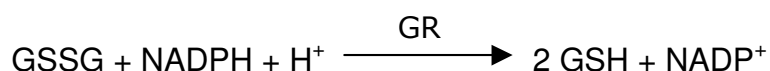
El grupo sulfhidrilo del glutatión reacciona con el reactivo de Ellman, DTNB (ácido 5, 5'- ditiobis- 2- nitrobenzoico) para dar el TNB (ácido 5- tio-2 nitrobenzoico) de color amarillo. De manera concomitante se produce el compuesto disulfuro GSTNB, entre el glutatión y el TNB, que reduce la GR para reciclar el glutatión reducido (GSH) y producir más TNB. La producción de TNB es directamente proporcional a esta reacción de reciclado que es a su vez directamente proporcional a la concentración de glutatión en la muestra. Para determinar la cantidad de glutatión se mide la absorbancia del TNB a 405 nm o 414 nm.

El GSH se oxida fácilmente a GSSG. El GSSG se produce durante la reducción de los hidroperóxidos por la enzima GPx. El GSSG se reduce a GSH por la enzima GR, y es en la forma reducida en la que el glutatión se encuentra principalmente en los sistemas biológicos. En el kit se usa la GR para medir las dos formas del glutatión (GSH y GSSG), de manera que lo que se mide es el glutatión total.

4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATIÓN REDUCTASA

La actividad de la enzima glutatión reductasa en plasma se evaluó mediante el método descrito por Barja de Quiroga (Barja de Quiroga y cols., 1990).

La actividad de la enzima glutatión reductasa, catalizadora de la reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido, se determina mediante la cuantificación de la desaparición del cofactor NADPH a 25°C, que se detecta a 340 nm:



Para la determinación de la glutatión reductasa es imprescindible medir tanto la reacción catalizada (reacción con muestra donde supuestamente hay GR) como la reacción no catalizada (reacción sin muestra, que se produce de manera espontánea en ausencia de enzima). La reacción no catalizada se lleva a cabo con GSSG 4 mM y NADPH 0,3 mM, en tampón fosfato 50 mM (pH 7,4) con EDTA 6,3 mM a 25°C. La reacción catalizada se lleva a cabo con un volumen establecido de muestra, GSSG 4 mM y NADPH 0,3 mM, en tampón fosfato 50 mM (pH 7,4) con EDTA 6,3 mM a 25°C. El consumo de NADPH en ambas reacciones, sigue una cinética de 4 min que se mide en el espectrofotómetro a 340 nm. Las proteínas de las muestras se miden mediante el método de Bradford.

La actividad enzimática se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad GR (nM NADPH/min mg proteína)} = \Delta\text{Abs/min} \times V_t \times \frac{F}{\epsilon \times V_m \times X}$$

Donde: $\Delta\text{Abs/min}$ = pendiente obtenida de la cinética de la reacción

V_t = volumen total de la cubeta = 0,7 ml

F = factor de dilución

ϵ = coeficiente de extinción molar del NADPH = $6,22 \times 10^{-3} \text{ ml} \cdot \text{nmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

V_m = volumen de muestra (ml)

X = mg proteína/ ml plasma

VII. MEDIDAS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA

1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- Ácido clorhídrico (HCl) (Panreac)
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma)
- Ácido tricloroacético (TCA) (Merck)
- Trizma base o TRIS (Sigma)
- Tampón fosfato salino 0,01 M con NaCl 0,138 M; KCl 0,0027 M; pH 7,4, a 25 °C (PBS)

2. EQUIPOS

- Lector de placas (Bio Kinetic Reader EL 340 Microplate, Bio-Tek Instruments).

3. MÉTODO TBARS

Uno de los productos que se generan en los procesos de peroxidación lipídica es el malondialdehído (MDA) que medimos en forma de aducto MDA-TBA de color rosa, mediante el método espectrofotométrico de las especies reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Rodriguez-Martinez y Ruiz-Torres en 1992.

Se mezclan las muestras de plasma o PBS (blanco) con TCA en HCl 0,6 M a una concentración final de 10% y se deja en hielo durante 20 minutos. Se centrifuga a 1.500 g, 15 min, temperatura ambiente. Se recoge el sobrenadante y se añade TBA 120 mM en TRIS 260 mM, pH= 7, en una proporción 1:5. A continuación se hierven las muestras durante 30 min. Se obtiene el aducto MDA-TBA de color rosa cuyo coeficiente de absorción molar es de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 535 nm. Se mide el compuesto obtenido en placas de 96 pocillos a 540 nm y temperatura ambiente.

La concentración de MDA de cada muestra se calcula a partir de la ley de Lambert-Beer, restando previamente a la absorbancia de la muestra la absorbancia del blanco:

$$A = C \times a \times b$$

Donde: A = absorbancia
 C = concentración (M)
 a = coeficiente de absorción molar = $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
 b = longitud de la cubeta o pocillo

VIII. ENSAYOS DE FUNCIÓN VASCULAR EN ARTERIAS AISLADAS

1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- Cloruro de acetilcolina (Sigma)
- Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF2-DA) (Sigma)
- Disolución Krebs Henseleit modificada (KHS): NaCl 115 mM, KCl 4,6 mM, CaCl_2 2,5 mM, NaHCO_3 25 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, MgSO_4 1,2 mM, EDTA 0,01 mM, glucosa 11 mM
- Fenilefrina (Sigma)
- Hidrocloruro de *N*ω-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) (Sigma)
- LGF (suministrado por el Dr. Díaz-Gil)
- Pirogalol (Sigma)
- Superóxido dismutasa (SOD) (Sigma)
- Tirón (Sigma)

2. EQUIPOS

- Sistema de medida de la tensión isométrica en segmentos arteriales, compuesto por: baños de órganos temostatizados, transductores de fuerza, tornillos micrométricos, amplificador y sistema de adquisición de datos MacLab/8e con el programa Chart & Scope v5 (ADInstruments) sistema de registro MacLab.
- Microscopio Confocal Espectral (Leica TCS SP2). Línea láser: 488 nm/515 nm

3. MEDIDA DE LA FUNCIÓN VASCULAR MEDIANTE REGISTRO DE LA TENSIÓN ISOMÉTRICA

La capacidad del LGF para proteger el NO vascular de la destrucción por el anión superóxido se llevó a cabo mediante experimentos de función vascular en arterias carótidas aisladas. Para ello, ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 3 meses de edad con un peso de aproximadamente 350-400 g se mataron mediante inhalación de CO₂. Se extrajeron las arterias carótidas comunes cuidadosamente, y se llevaron a una disolución fisiológica KHS burbujeada con carbógeno (95% de O₂, 5% de CO₂) y mantenida a 37°C. La función vascular se estudió mediante la monitorización de la tensión isométrica según se describe en Conde y cols., 2000; Somoza y cols., 2006, que se basa en la técnica descrita por Nielsen y Owman en 1971 y esquematizado en la Figura 12.

Sistema de registro Maclab

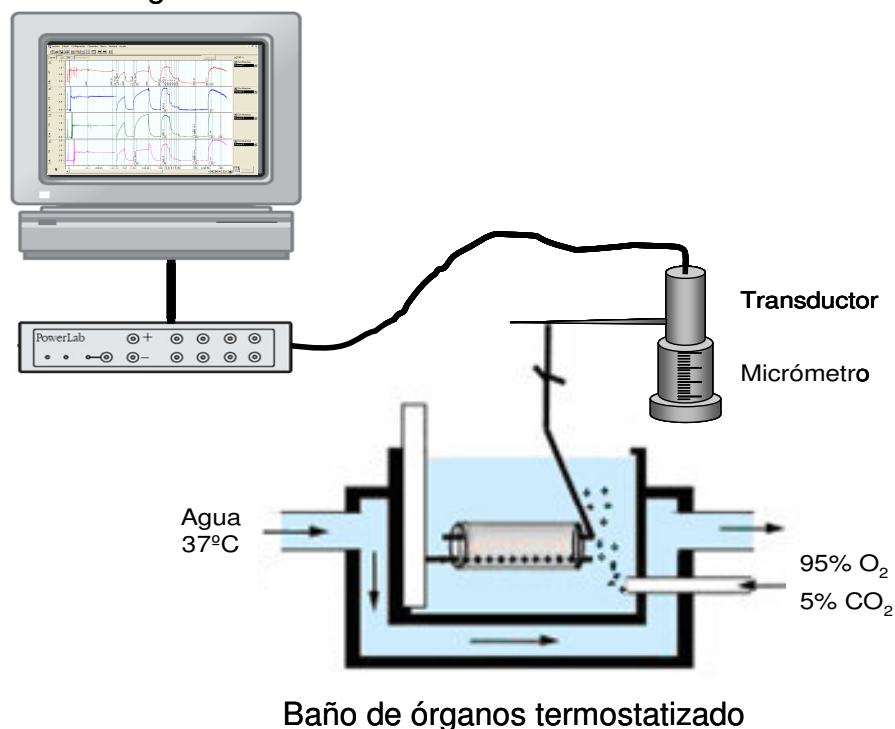


Figura 12. Representación esquemática del modelo experimental utilizado para el registro de la tensión isométrica.

Una vez extraídas las arterias carótidas comunes, se pasaron a una placa con KHS fría y oxigenada. Para limpiar la luz vascular de restos de sangre se introdujo una aguja roma por uno de sus extremos y se perfundió con KHS con suavidad para no dañar el endotelio. También se eliminaron los restos de tejido conectivo y adiposo adheridos a la arteria, siempre con cuidado de no dañarla. Posteriormente, la arteria se troceó en anillos de 3 mm de longitud con la ayuda de una lupa binocular y de una regla milimetrada, despreciando los extremos por los que habíamos introducido la aguja con anterioridad y con cuidado de no dañar la pared vascular.

A través de la luz del cilindro arterial se introdujeron dos alambres de acero rígido de 168 μm de diámetro. Uno de ellos se fija a la pared de un baño que contiene 1 ml de disolución KHS. El otro alambre, que se desplaza paralelamente

al anterior, se conecta con un transductor de fuerza (Piodem controls LTD. Dynamometer. Cibertec SA. España). El transductor se conecta, a su vez, a un amplificador y a un sistema de adquisición de datos MacLab/8e con el programa Chart & Scope v5 (ADInstruments) donde se registraron los cambios de tensión producidos en la pared del segmento arterial. La temperatura del baño se mantuvo constante a $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, mediante una doble pared por donde circula agua procedente de un termocirculador (Techna TE1 Tempeltec). Cada baño de órganos posee una entrada de carbógeno para oxigenar de forma adecuada las preparaciones y mantener un pH fisiológico.

Mediante un tornillo micrométrico se aplicó a cada segmento una tensión inicial de 1,0 g (tensión óptima determinada en experimentos preliminares). La tensión se fue reajustando periódicamente cada 15 minutos durante un periodo de 60 a 90 minutos, y cambiando al mismo tiempo el líquido nutricio hasta lograr su completa estabilización.

Una vez estabilizadas las preparaciones, se les administró una disolución despolarizante de KCl (75 mM) para comprobar su integridad funcional. Tras 30 minutos de lavado se repitió la administración de KCl.

Para estudiar la capacidad relajante de las arterias carótidas comunes los segmentos arteriales se contrajeron con fenilefrina $0,1\ \mu\text{M}$ hasta alcanzar una respuesta estable. Una vez alcanzada ésta, se añadieron concentraciones crecientes de acetilcolina (ACh $0,1\ \text{nM}$ - $100\ \mu\text{M}$). En experimentos preliminares se comprobó que la funcionalidad de los segmentos se mantenía a lo largo de varias curvas de concentración-respuesta consecutivas. Se consideró que los segmentos tenían endotelio funcional cuando se alcanzó una relajación máxima a ACh de $>75\%$ de la contracción previa con fenilefrina. La dependencia de NO de la relajación producida por ACh se determinó mediante preincubación durante 20 minutos con $100\ \mu\text{M}$ L-NAME (inhibidor de la síntesis de NO). Las relajaciones se

expresaron en porcentaje de la contracción producida por fenilefrina previa a la administración de ACh.

Para generar anión superóxido se utilizó pirogalol, que produce el radical libre mediante autooxidación (Marklund y Marklund, 1974; Hutchinson y cols., 1987). Tras comprobar la funcionalidad del endotelio mediante una curva concentración respuesta a ACh (0,1 nM-100 μ M) se añadió pirogalol 1 μ M al baño de órganos durante 20 min y se realizó una segunda curva a ACh.

Para determinar el efecto antioxidante de los diversos compuestos frente a anión superóxido, en primer lugar se comprobó la funcionalidad del endotelio mediante una curva concentración respuesta a ACh (0,1 nM-100 μ M). Seguidamente los segmentos se incubaron simultáneamente con pirogalol 1 μ M y con SOD (15 U/ml), con Tiron (10 mM) o con LGF (0,3 mM) durante 20 minutos y posteriormente se realizó una segunda curva a ACh.

4. DETERMINACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD BASAL DE ÓXIDO NÍTRICO MEDIANTE DAF2-DA

Para el estudio de la biodisponibilidad de NO se utilizó el indicador fluorescente 4,5 diacetato de diaminofluoresceína, (DAF2-DA), que permite monitorizar la producción de NO en arterias (Kojima y cols 1998, Zhang y cols 2002). El DAF2-DA es un compuesto no fluorescente que atraviesa la membrana plasmática de las células vivas. En el citoplasma, las esterasas hidrolizan el grupo diacetato (DA) de modo que el DAF-2 pierde la capacidad de atravesar la membrana. En el interior de la célula, en presencia de NO y O₂, el DAF-2 se nitrosila, originando un compuesto triazólico altamente fluorescente. Este compuesto puede ser visualizado con una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 515 nm. La nitrosilación es irreversible (Lewis y cols 1995), por lo que la fluorescencia emitida refleja la disponibilidad total del NO. El protocolo experimental se realizó de acuerdo al descrito en González y cols., 2008.

Los segmentos se incubaron durante 30 minutos en una disolución que contenía DAF2-DA 10 μ M, en la oscuridad, en un baño mantenido a 37°C y burbujeadado con carbógeno. Para comprobar que la fluorescencia provenía del NO se realizó un control negativo preincubando con L-NAME 100 μ M durante 30 minutos y, posteriormente, añadiendo al medio de incubación el DAF2-DA durante otros 30 minutos. Finalmente, los segmentos arteriales fueron fijados durante 45 minutos en paraformaldehído al 4%, para su posterior estudio en un microscopio confocal de fluorescencia (Figura 13). El montaje de los segmentos y la obtención de imágenes mediante microscopía confocal se realizaron de forma similar a lo descrito para la obtención de imágenes con DHE, utilizando la longitud de onda de excitación 488 y emisión 515nm.

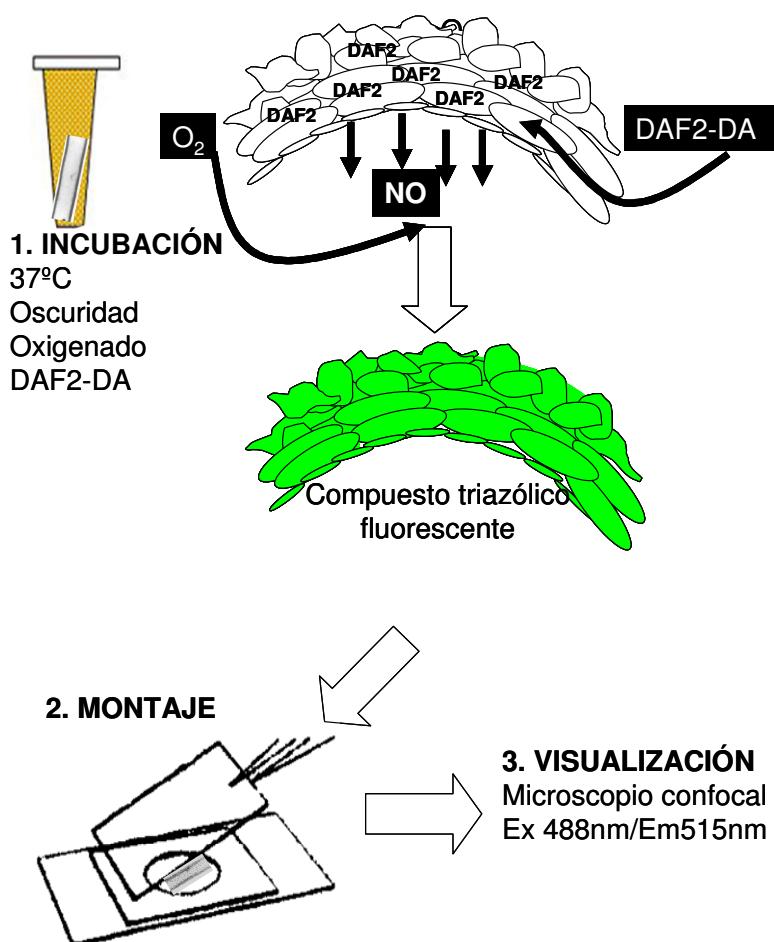


Figura 13. Esquema representativo del método para la determinación de producción basal de óxido nítrico mediante DAF2-DA.

IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de cada experimento se han expresado con su valor medio y el correspondiente error estándar como medida de dispersión. Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático Graph Pad Prism 04. Las medias se compararon usando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) o el test de Student. Se consideró que las diferencias eran significativas para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

I. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL LGF *IN VITRO*

Se estudió la capacidad antioxidante del LGF frente a diferentes radicales libres en un medio acuoso *in vitro*, y se comparó con la de sus dos componentes: la albúmina y la bilirrubina.

1. CAPACIDAD PARA ELIMINAR EL RADICAL CATIÓN ABTS

Se midió la capacidad del LGF, de la albúmina y de la bilirrubina para eliminar radicales libres sintéticos. Para este estudio se utilizó como radical libre sintético, el radical catión ABTS y como antioxidante de referencia el Trolox que es un compuesto hidrosoluble análogo de la vitamina E.

En primer lugar, los resultados se expresaron como porcentajes de inhibición del radical catión ABTS por los compuestos a varias concentraciones, expresadas en ng/μl. El LGF, la albúmina y la bilirrubina presentaron capacidad para eliminar el catión radical ABTS, siendo el porcentaje de inhibición directamente proporcional a la concentración de los compuestos (Figura 14A1 y 14A2). El LGF y la bilirrubina se comportaron como el Trolox, siendo lineal el porcentaje de inhibición frente a la concentración. En cambio la albúmina no mostró una tendencia o regresión de línea recta sino de polinomio, para el mismo rango de concentraciones. Se comparó el porcentaje de inhibición del LGF, la bilirrubina y el Trolox en el mismo rango de concentraciones (en unidades de peso/volumen (ng/μl)), siendo la bilirrubina la que presentó mayor capacidad antioxidante (mayor pendiente), después el Trolox y por último el LGF (Figura 14A1). La albúmina presentó la menor capacidad antioxidante y a concentraciones mucho más elevadas (Figura 14A1).

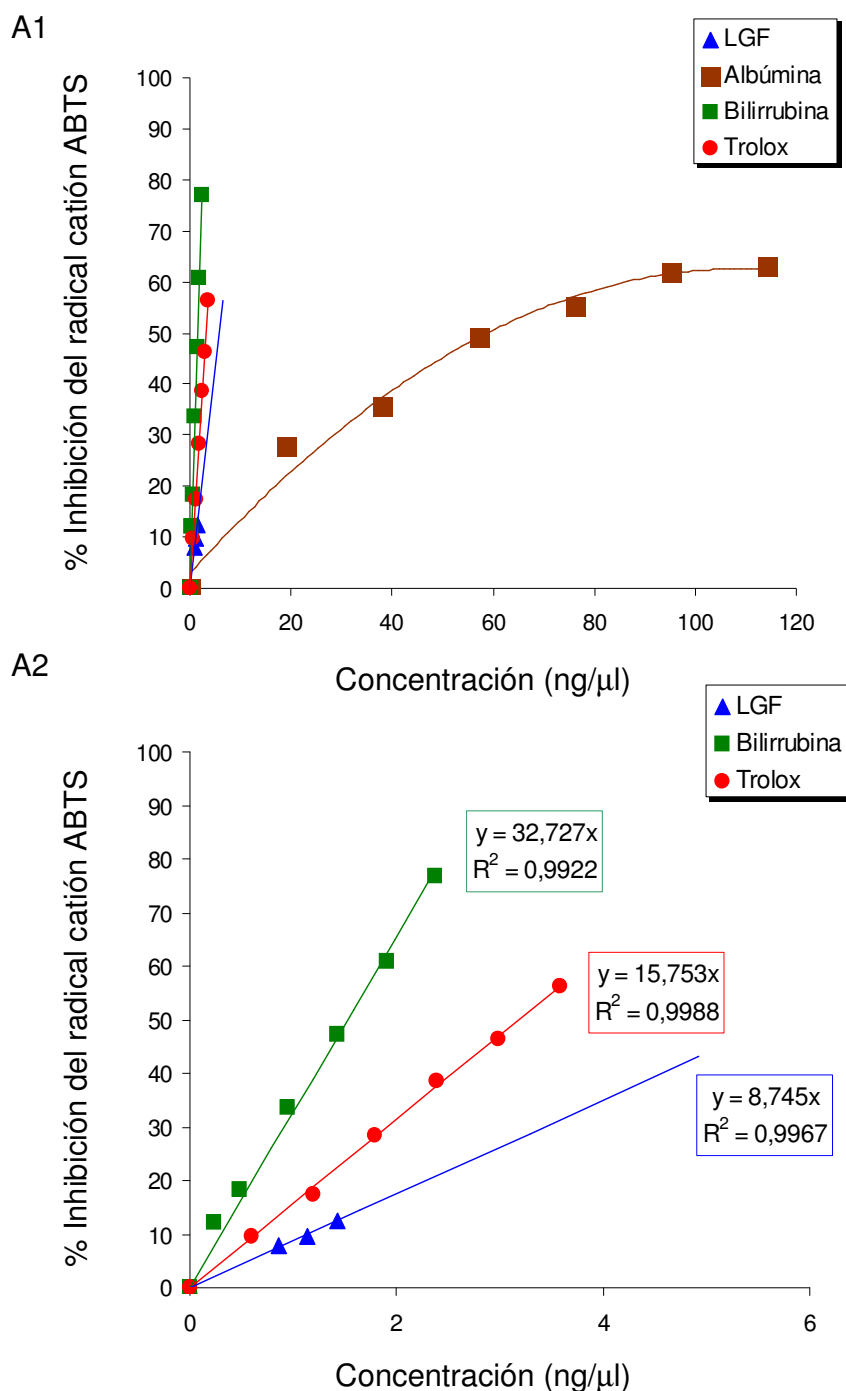
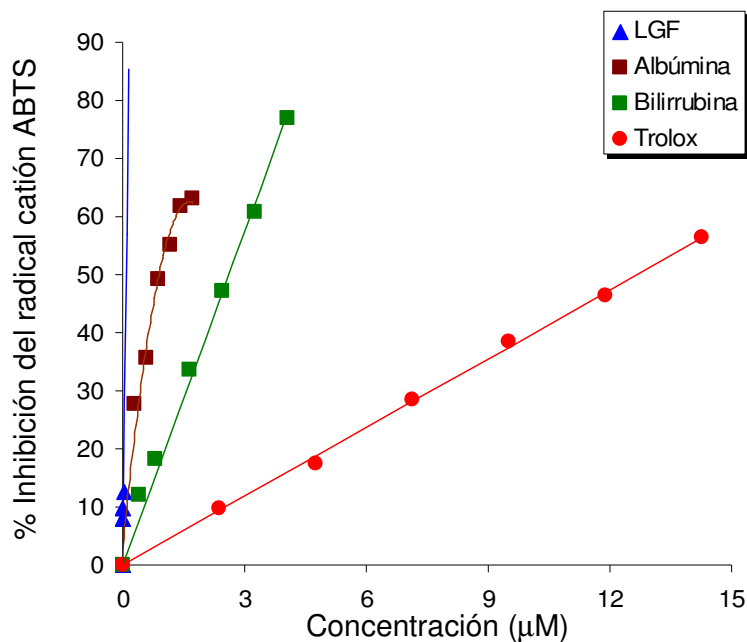


Figura 14 A. A1) Inhibición del radical catión ABTS por el LGF, la albúmina, la bilirubina hidrosoluble y el Trolox a distintas concentraciones (ng/μl). **A2)** Ampliación de la inhibición del radical catión ABTS por el LGF, la bilirubina hidrosoluble y el Trolox. Cada valor es la media de 3 réplicas.

Si tenemos en cuenta el peso molecular de los compuestos, y expresamos los resultados en unidades molares (μM), se demuestra que el LGF es el

compuesto con mayor capacidad para eliminar radicales ABTS (Figuras 14B1 y 14B2).

B1



B2

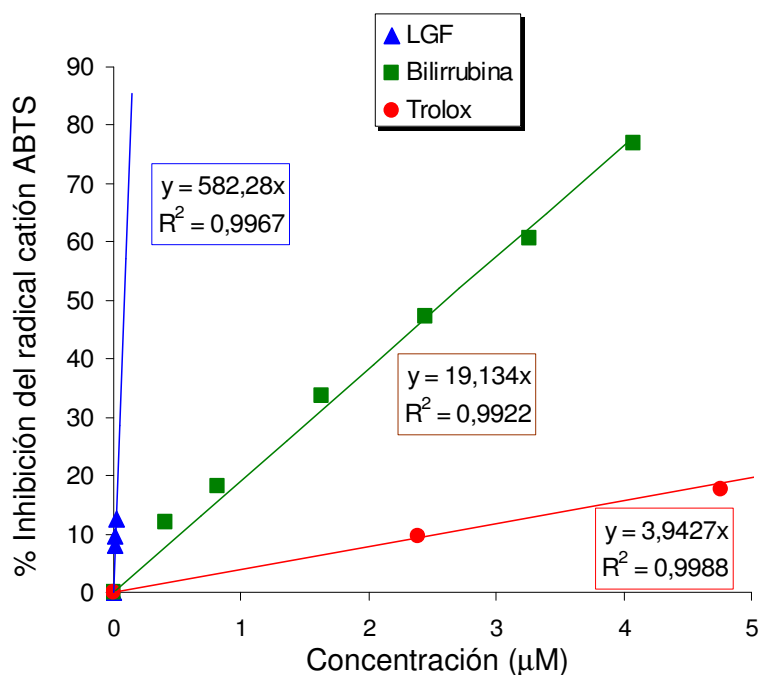


Figura 14 B. B1) Inhibición del radical catión ABTS por el LGF, la albúmina, la bilirubina hidrosoluble y el Trolox a distintas concentraciones (μM). **B2)** Ampliación de la inhibición del radical catión ABTS por el LGF, la albúmina y la bilirubina hidrosoluble. Cada valor es la media de 3 réplicas.

Para determinar la cinética de inhibición del radical catión ABTS por el LGF y la bilirrubina, se calculó la “Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox” (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) -TEAC- de cada una de ellas (Figura 15) y a distintos tiempos de reacción. Los valores TEAC del LGF y la bilirrubina aumentaron a lo largo del tiempo describiendo una cinética bifásica, sin embargo el valor TEAC de la albúmina fue prácticamente nulo. Las concentraciones de los compuestos utilizadas para este estudio fueron de 8,3 ng/μl y en unidades de molaridad: LGF 0,12 μM, albúmina 0,13 μM y bilirrubina 14 μM.

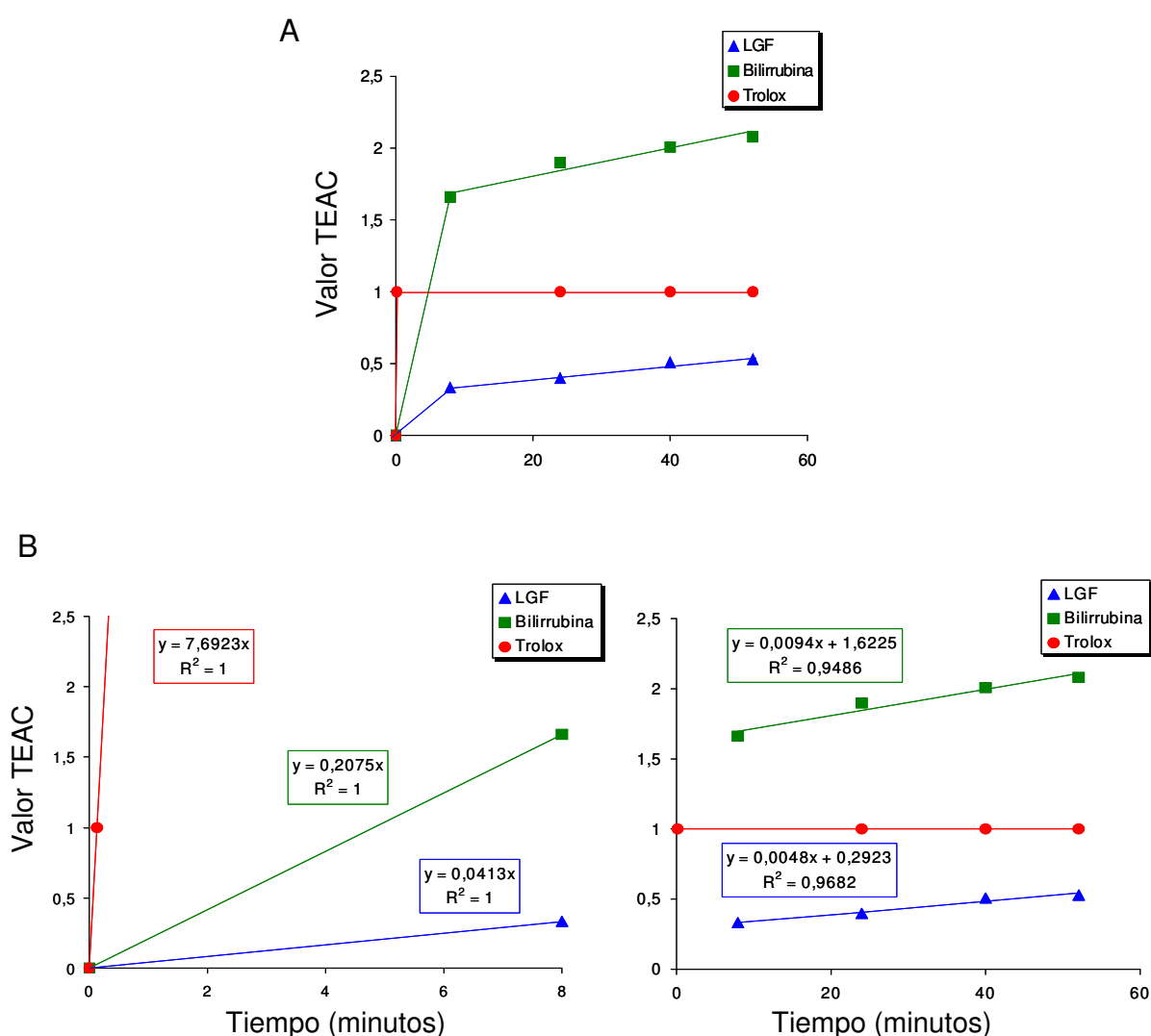


Figura 15. A) Cinética bifásica de inhibición del radical catión ABTS con el LGF, la bilirrubina hidrosoluble y el Trolox. **B)** Descomposición de la cinética bifásica: a la izquierda la fase rápida, y a la derecha la fase lenta.

2. CAPACIDAD PARA ELIMINAR EL RADICAL PEROXILO

Se evaluó la capacidad del LGF, la albúmina y la bilirrubina para eliminar radicales peroxilo, que se generaron con el compuesto AAPH. Mediante el método ORAC-FL se hizo un seguimiento de la caída de la fluorescencia producida por los radicales peroxilo a lo largo del tiempo, y su variación en presencia de los distintos compuestos. Se hizo un blanco sin AAPH para verificar la generación de radicales libres y se utilizó como antioxidante de referencia el Trolox 0,25 ng/μl (1 μM). En primer lugar mostramos los resultados mediante las curvas de caída de fluorescencia, que indican el perfil antioxidante de los distintos compuestos (Figuras 16A1,2,3 y 4); y en segundo lugar se muestran las áreas bajo la curva, calculadas a partir de las curvas de caída de fluorescencia, que indican la capacidad antioxidante total de los compuestos (Figuras 16B1,2,3 y 4).

El perfil de la curva descrita por el antioxidante de referencia Trolox, muestra una fase de retraso inicial que no se ve en los demás compuestos, y le confiere su capacidad antioxidante, que es mayor que la del resto de los compuestos estudiados, sin embargo hay un punto en el que la curva del Trolox se cruza con la del blanco con AAPH, lo que indica que su efecto antioxidante es menos duradero que el de otros compuestos estudiados que comentaremos a continuación. El LGF se estudió a distintas concentraciones: 1,5 ng/μl, 2,2 ng/μl y 3 ng/μl (0,02 μM, 0,03 μM y 0,05 μM respectivamente), presentando capacidad para eliminar radicales peroxilo a todas las concentraciones estudiadas y de manera concentración dependiente, además se puede observar que en hay un punto en el que la curva del LGF a 2,2 ng/μl y 3 ng/μl se cruza con la del Trolox, mostrando una capacidad antioxidante más duradera (Figura 16A1). La albúmina se probó a las concentraciones de: 2,2 ng/μl, 4,5 ng/μl y 9 ng/μl (0,03 μM, 0,07 μM y 0,14 μM, respectivamente), pero a la concentración de 2 ng/μl no redujo la caída de la fluorescencia, y a las otras dos concentraciones la reducción fue muy pequeña (Figura 16A2). La bilirrubina se probó a 3 ng/μl (5 μM) y apenas redujo la caída de la fluorescencia (Figura 16A3).

En la Figura 16A4 se comparan las curvas de caída de fluorescencia del LGF 3 ng/μl (0,05 μM), la albúmina 9 ng/μl (0,14 μM), la bilirrubina 3 ng/μl (5 μM) y el Trolox 0,25 ng/μl (1 μM), donde se puede ver que el Trolox es el que presenta menor caída de fluorescencia, pero se cruza con la curva del LGF. El LGF tiene menor caída de fluorescencia que la bilirrubina y la albúmina.

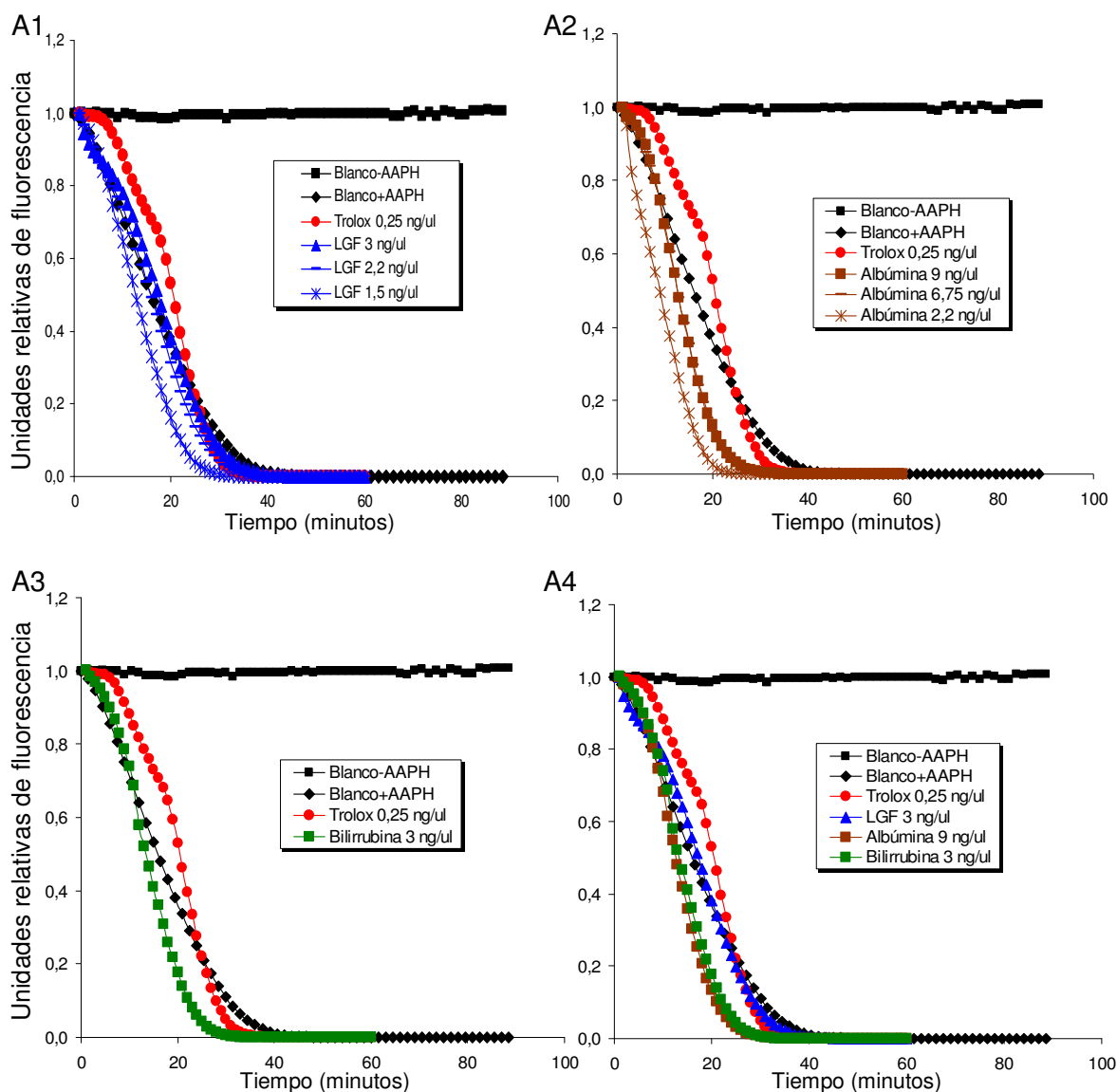


Figura 16A. Curvas de caída de fluorescencia inducida por el radical peroxilo generado por AAPH y el efecto del: **A1)** LGF a distintas concentraciones 1,5 ng/μl, 2,2 ng/μl y 3 ng/μl (0,02μM, 0,03μM y 0,05μM respectivamente), **A2)** de la seroalbúmina de rata a distintas concentraciones 2,2 ng/μl, 4,5 ng/μl y 9 ng/μl (0,03μM, 0,07μM y 0,14μM, respectivamente), **A3)** de la bilirrubina hidrosoluble a 3 ng/μl (5μM). **A4)** Comparación del LGF a 3 ng/μl (0,05μM), la seroalbúmina de rata a 9 ng/μl (0,14μM), la bilirrubina hidrosoluble 3 ng/μl (5μM) y el Trolox 0,25 ng/μl (1μM). Cada valor corresponde al promedio de tres réplicas.

A partir de las gráficas anteriores se calcularon las áreas bajo la curva (ABC) de los distintos compuestos, y se restó el ABC del blanco con AAPH. Este parámetro nos indica la capacidad de cada compuesto para eliminar el radical peroxilo. En las Figuras 16B1-3 se muestran las ABC de los compuestos estudiados, a distintas concentraciones y se comparan con el antioxidante de referencia Trolox. En la Figura 16B4 se compara el ABC del LGF, la albúmina y la bilirrubina frente al Trolox.

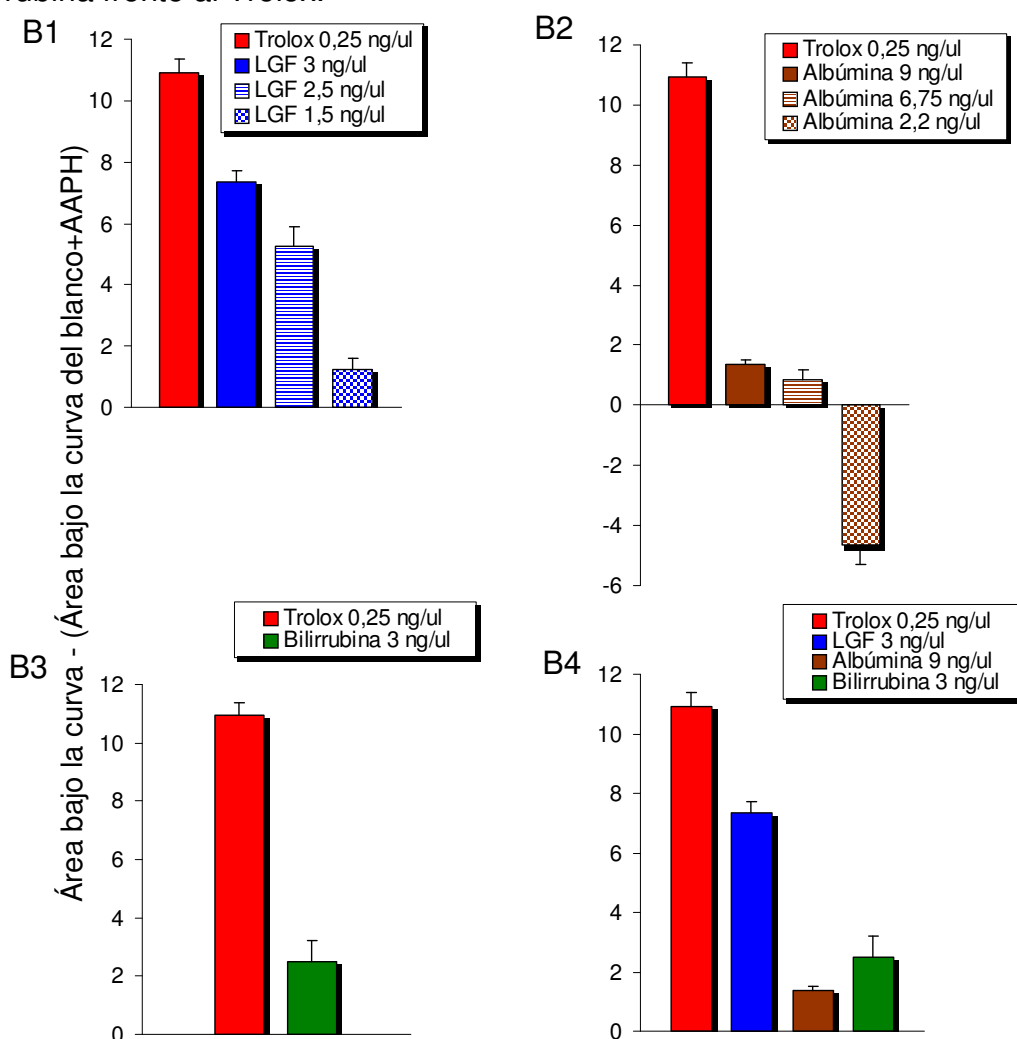


Figura 16B. Representaciones de las áreas bajo la curva **B1)** del LGF a distintas concentraciones 1,5 ng/μl, 2,2 ng/μl y 3 ng/μl (0,02μM, 0,03μM y 0,05μM respectivamente), **B2)** de la seroalbúmina de rata a distintas concentraciones 2,2 ng/μl, 4,5 ng/μl y 9 ng/μl (0,03μM, 0,07μM y 0,14μM, respectivamente), **B3)** de la bilirrubina hidrosoluble a 3 ng/μl (5μM). **B4)** Comparación de las áreas bajo la curva del LGF a 3 ng/μl (0,05μM), la seroalbúmina de rata a 9 ng/μl (0,14μM), la bilirrubina hidrosoluble 3 ng/μl (5μM) y el Trolox 0,25 ng/μl (1μM). Cada valor corresponde al promedio de tres réplicas.

3. CAPACIDAD PARA ELIMINAR EL RADICAL HIDROXILO

Se estudió la capacidad del LGF, la albúmina y la bilirrubina, para eliminar el radical hidroxilo, mediante el método de la desoxirribosa modificado por el que se mide el grado de inhibición del aducto MDA-TBA. Se estudió la capacidad del LGF y la bilirrubina a distintas concentraciones (datos no mostrados). En la figura 17A1 se muestra la capacidad para eliminar radicales hidroxilo del LGF 30 ng/μl (0,45 μM), la albúmina 1000 ng/μl (15 μM) y la bilirrubina 30 ng/μl (51 μM) frente al antioxidante de referencia Trolox 10 ng/μl (40 μM). En la figura 17A2 se pueden apreciar las diferencias entre los compuestos de estudio, el LGF 30 ng/μl (0,45 μM), la albúmina 1000 ng/μl (15 μM) y la bilirrubina 30 ng/μl (51 μM); se puede observar que el LGF mostró una capacidad para eliminar radicales hidroxilo similar a la de la bilirrubina 30 ng/μl (51 μM), y mayor que la de la albúmina 1000 ng/μl (15 μM).

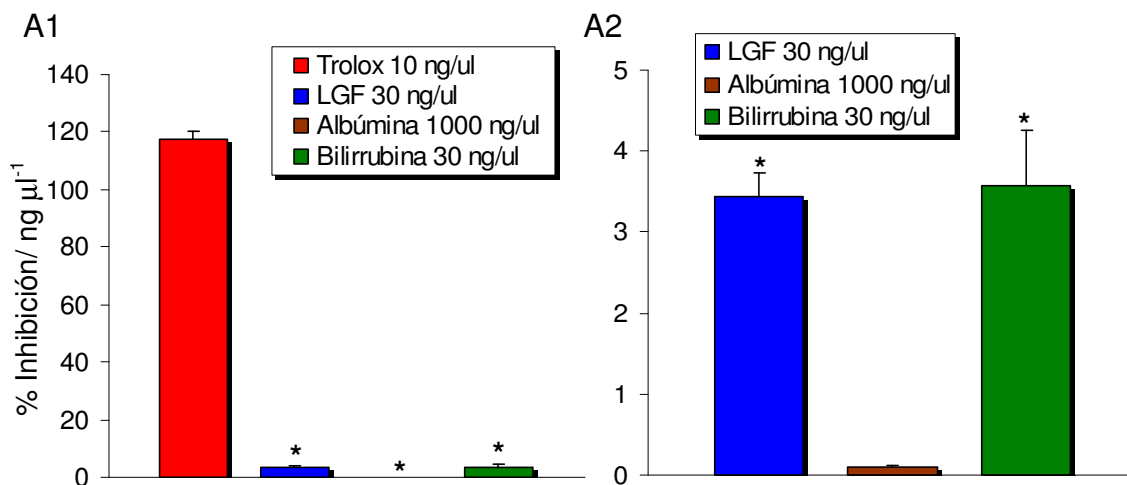


Figura 17A. Capacidad de eliminar radicales hidroxilo **A1)** del LGF 30 ng/μl (0,45 μM), la seroalbúmina de rata 1000 ng/μl (15 μM) y la bilirrubina hidrosoluble 30 ng/μl (51 μM) frente al antioxidante de referencia Trolox 10 ng/μl (40 μM), * $p < 0,05$ respecto al Trolox; **A2)** del LGF 30 ng/μl (0,45 μM), la seroalbúmina de rata 1000 ng/μl (15 μM) y la bilirrubina hidrosoluble 30 ng/μl (51 μM), * $p < 0,05$ respecto a la seroalbúmina de rata; análisis estadístico con el test de Student. Cada valor corresponde al promedio de tres réplicas.

A continuación se muestra, en la gráfica de la pendiente (A/A_0) a 540 nm, frente a la concentración inicial (Figura 18A), la cinética de la reacción de los compuestos con el radical hidroxilo. Se demostró que el LGF y la bilirrubina tenían una capacidad antioxidante frente a radicales hidroxilo dependiente de la concentración de forma lineal. Sin embargo capacidad antioxidante frente a radicales hidroxilo de la albúmina, aunque también fue dependiente de la concentración, su tendencia no se ajustó a una línea recta (Figura 18A1). Además el LGF y la bilirrubina mostraron una cinética competitiva frente a radicales hidroxilo. Las constantes de velocidad calculadas a partir de las pendientes de la Figura 18A2, fueron de $1,58 \times 10^{15} \text{ ng } \mu\text{l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $1,25 \times 10^{15} \text{ ng } \mu\text{l}^{-1} \text{ s}^{-1}$, para el LGF y la bilirrubina, respectivamente. Estas constantes no fueron significativamente diferentes entre sí.

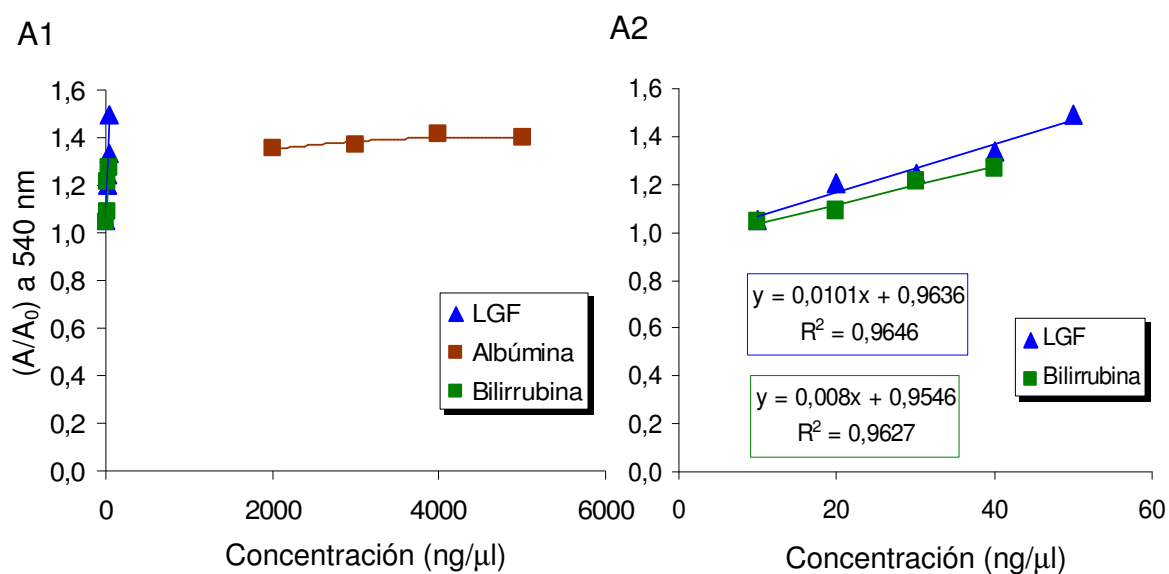


Figura 18A. Cinética de reacción entre el radical hidroxilo y **A1)** el LGF, la seroalbúmina de rata y la bilirrubina hidrosoluble, a distintas concentraciones (ng/μl), **A2)** el LGF y la bilirrubina hidrosoluble, a distintas concentraciones (μM). Cada valor corresponde al promedio de tres réplicas.

Sin embargo, al representar los resultados por concentraciones en unidades de molaridad, vemos que el LGF tiene una capacidad antioxidante mucho mayor que la bilirrubina y la albúmina (Figura 18B). Las constantes de

velocidad calculadas a partir de las pendientes de la Figura 18A, fueron de $5.839 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $41 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, para el LGF y la bilirrubina, respectivamente.

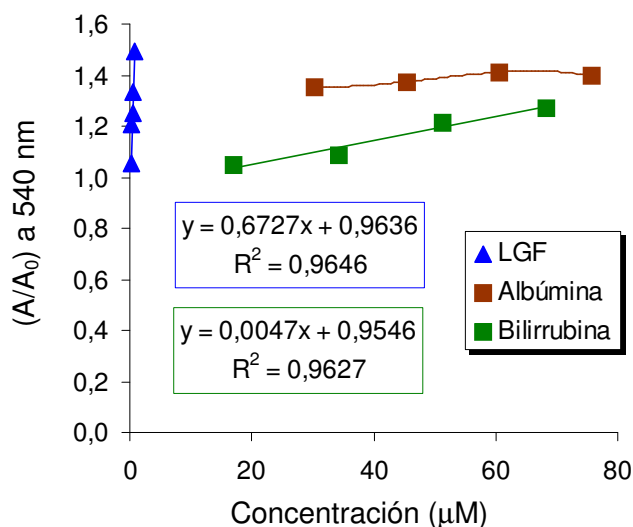


Figura 18B. Cinética de reacción entre el radical hidroxilo y el LGF, la seroalbúmina de rata y la bilirrubina hidrosoluble, a distintas concentraciones (μM).

La capacidad captadora del LGF frente a radicales hidroxilo fue confirmada por un ensayo de quimioluminiscencia, en el que el LGF mostró que su efecto era dependiente de la concentración (Figura 19).

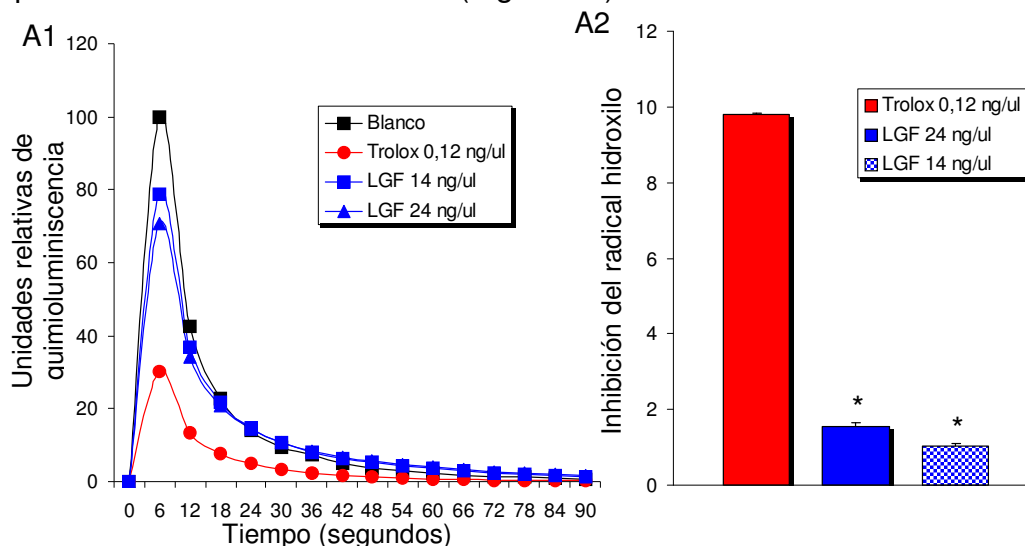


Figura 19A. A1) Curva de aumento de quimioluminiscencia inducida por radicales hidroxilo y reducción por LGF 14 ng/ μl (0,21 μM) y 24 ng/ μl (0,36 μM); y Trolox 0,12 ng/ μl (0,48 μM). A2) Capacidad antioxidante del LGF 14 ng/ μl (0,21 μM) y 24 ng/ μl (0,36 μM); y Trolox 0,12 ng/ μl (0,48 μM), * $p < 0,05$ respecto al Trolox (test de Student). Cada valor es la media de 3 réplicas.

4. CAPACIDAD PARA ELIMINAR EL RADICAL ANIÓN SUPERÓXIDO

Se midió la capacidad del LGF para eliminar radicales anión superóxido de forma indirecta, determinando la capacidad del LGF para proteger el óxido nítrico vascular. Para ello se adicionó acetilcolina (ACh) que produce respuestas de relajación-concentración dependientes de óxido nítrico. Como fuente de radicales anión superóxido se utilizó el pirogalol que en disolución acuosa se descompone produciendo estos radicales (Marklund y Marklund, 1974).

Se preincubaron los segmentos de arteria carótida de rata normotensa SD sólo con ACh (control), con pirogalol y con los compuestos de estudio. La preincubación con el pirogalol, produjo una reducción en la relajación mediada por la acetilcolina del 42% (Figura 20A1). La preincubación con el pirogalol y el LGF 0,3 nM, produjo una reducción en la relajación mediada por la acetilcolina del 71% (Figura 20A2). La preincubación con el pirogalol y la enzima antioxidante SOD 15 U/ml, produjo una reducción en la relajación mediada por la acetilcolina del 65% (figura 20A3). La preincubación con el pirogalol y el Tiron 10 mM (mimético permeable de la SOD), produjo una reducción en la relajación mediada por la acetilcolina del 89% (Figura 20A4).

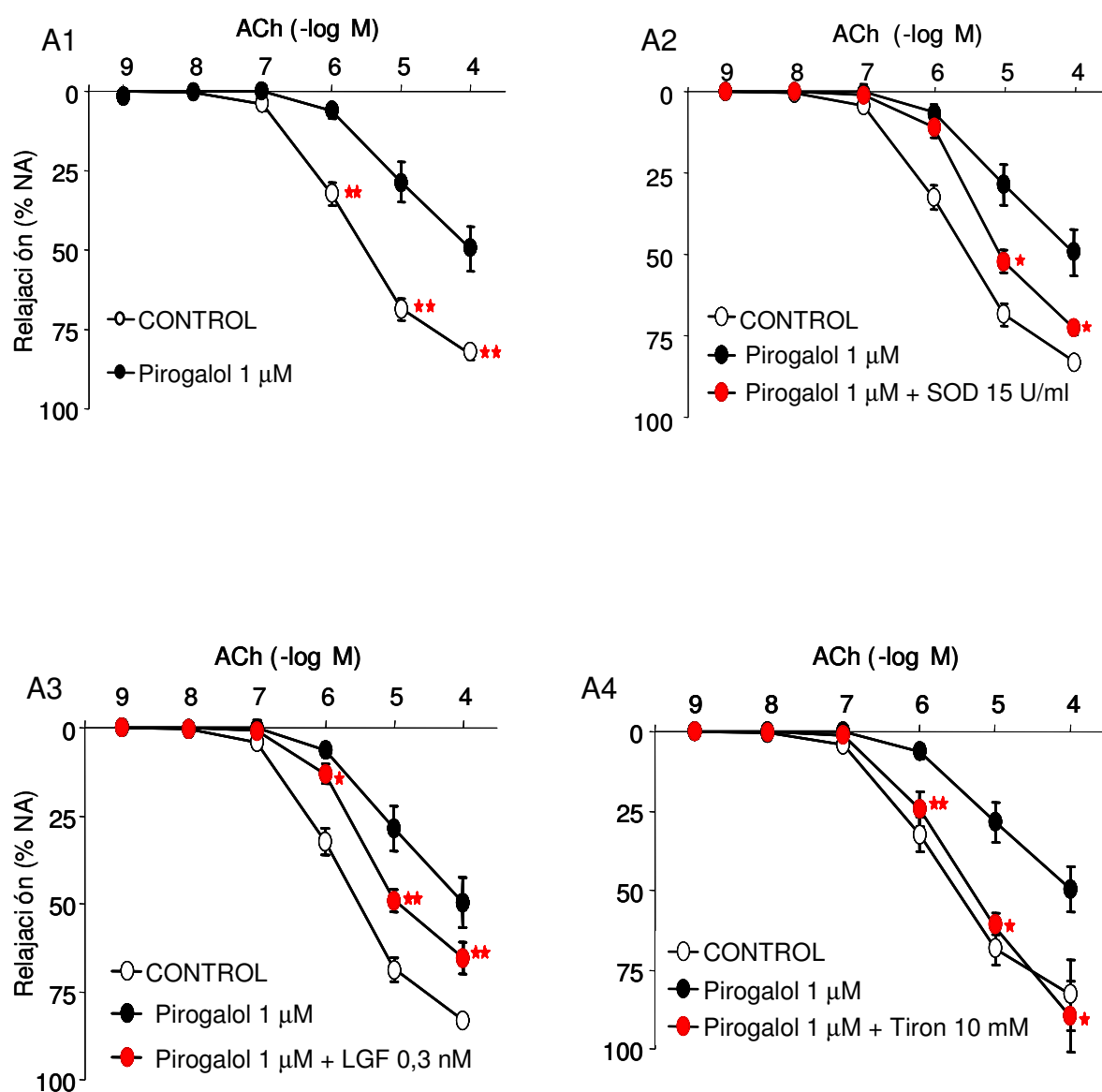


Figura 20A. Curvas concentración respuesta a acetilcolina (ACh) en segmentos de arteria carótida de rata normotensa SD. Efecto: **A1)** del pirogalol 1 μM, **A2)** de la SOD 15 U/ml, **A3)** del LGF 0,3 nM, y **A4)** del Tiron 10 mM, sobre las repuestas vasodilatadoras en presencia del pirogalol 1 μM, *p<0,05 con respecto al pirogalol; análisis estadístico con el test de Student.

II. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE RATAS SHR CON LGF SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA NAD(P)H OXIDASA Y SOBRE LA PRODUCCIÓN DEL RADICAL ANIÓN SUPERÓXIDO

1. ACTIVIDAD NAD(P)H OXIDASA

La actividad de la NAD(P)H oxidasa se determinó mediante la generación de cuantos de luz tras la adición del sustrato NADH a segmentos de arteria carótida en presencia de lucigenina. El estudio se llevó a cabo en segmentos vasculares procedentes de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con LGF. La producción de cuantos de luz tras la adición de NADH fue significativamente mayor en ratas SHR comparadas con ratas WKY. En las arterias de ratas SHR tratadas con LGF se produjo una reducción significativa de la generación de anión superóxido por el enzima, alcanzándose valores similares a los de la rata WKY (Figura 21).

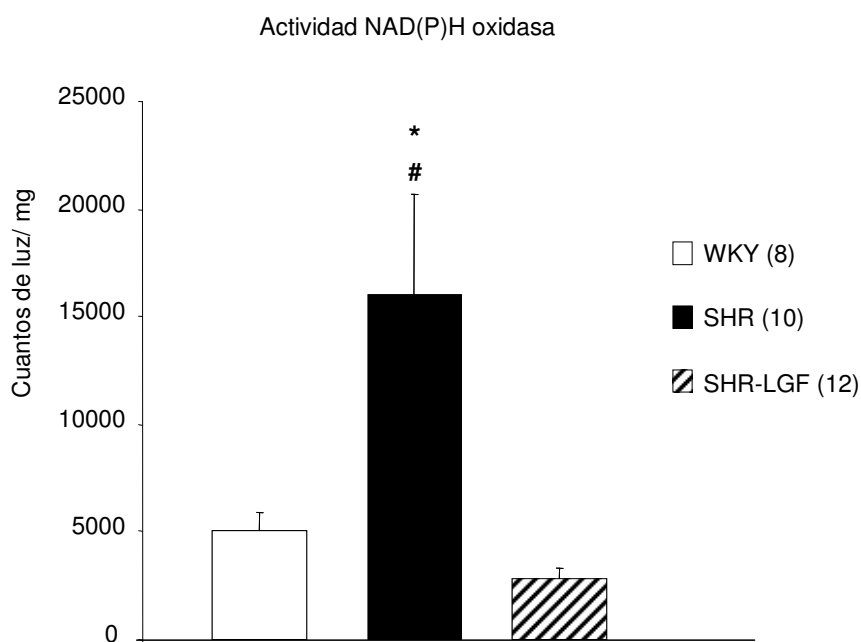


Figura 21. Cuantos de luz tras la estimulación de la enzima NAD(P)H oxidasa en arterias carótidas de ratas WKY, SHR y SHR tratada con LGF (SHR-LGF). Entre paréntesis se indica el número de ratas utilizado. * $p < 0,05$ con respecto a WKY; # $p < 0,05$ con respecto a SHR sin tratar, análisis estadístico mediante el test de Student.

La adición de Tiron 10 mM -análogo soluble de la SOD-, tras la estimulación del enzima con NADH, redujo significativamente la producción de anión superóxido, siendo esta reducción similar en los tres grupos experimentales (Figura 22A1). Por otra parte, en ratas SHR se demostró que la reducción de la producción de anión superóxido por Tiron era concentración dependiente, siendo aproximadamente el doble tras la adición de 20 mM del análogo permeable de la SOD (Figura 22A2). Además, la preincubación de las arterias carótidas de ratas SHR con el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa DPI, redujo significativamente la producción de cuantos de luz tras la estimulación del enzima con NADH ($40 \pm 11\%$ reducción, $n=5$ arterias comparadas con sus contralaterales sin DPI).

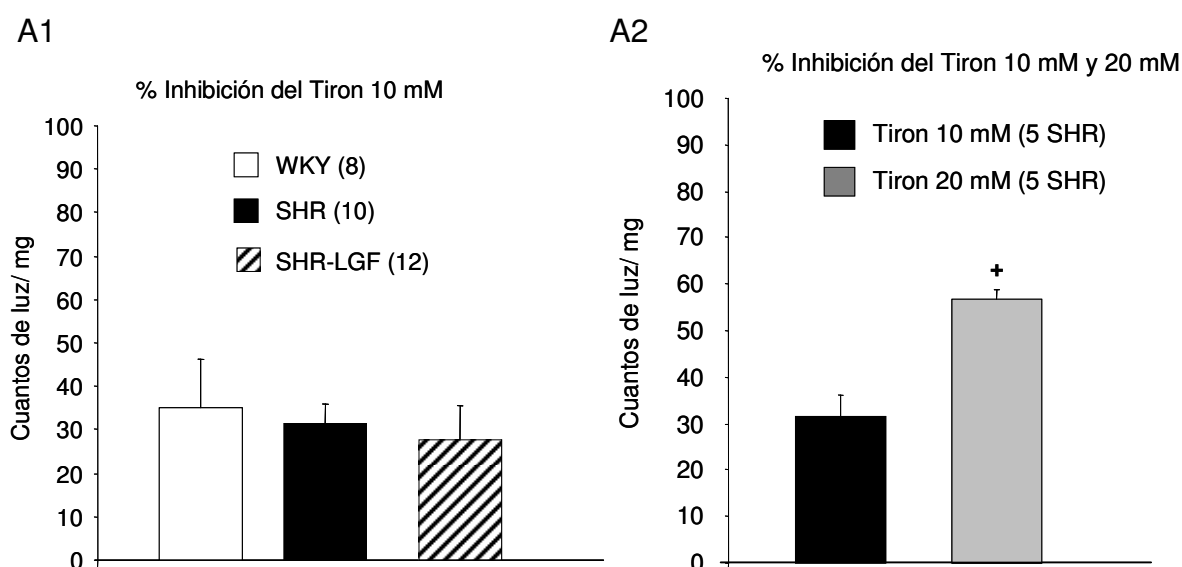


Figura 22A. A1) Efecto de la adición de Tiron 10 mM sobre la emisión de cuantos de luz tras la estimulación del enzima NAD(P)H oxidasa por arterias carótidas de ratas WKY, SHR y SHR tratada con LGF (SHR-LGF). **A2)** Efecto de la concentración de Tiron (10 y 20 mM) sobre la emisión de cuantos de luz tras estimulación del enzima NAD(P)H oxidasa por arterias carótidas de ratas SHR. Entre paréntesis se indica el número de ratas utilizado. ⁺ $p < 0,05$ con respecto a 10 mM. Análisis estadístico mediante el test de Student.

2. CUANTIFICACIÓN DEL RADICAL ANIÓN SUPERÓXIDO

Producción del radical anión superóxido en arterias carótidas. La producción basal del radical anión superóxido se estudió mediante quimioluminiscencia, no observándose diferencias significativas entre la emisión de cuantos de luz de ratas WKY y SHR. El tratamiento con LGF tampoco modificó significativamente la producción basal del radical, aunque hubo una tendencia a reducirlo (Figura 23).

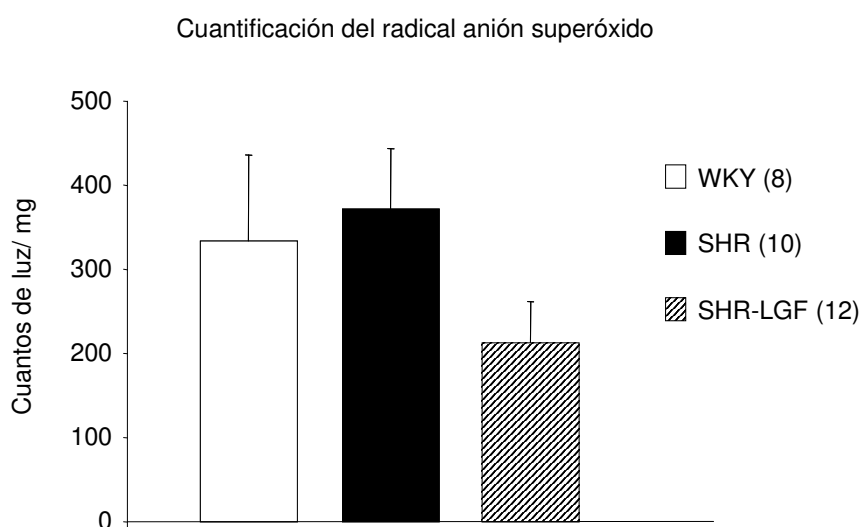


Figura 23. Emisión de cuantos de luz en situación basal en arterias carótidas de ratas WKY, SHR y SHR tratada con LGF (SHR-LGF). Entre paréntesis se indica el número de ratas utilizado. Análisis estadístico mediante el test de Student.

La cantidad de radical anión superóxido también se estudió mediante el método del DHE, que es un método más sensible que el de la lucigenina. Este estudio se realizó en cultivos primarios de CML procedentes de arterias carótidas así como en arterias mesentéricas de resistencia de los tres grupos experimentales: WKY, SHR y SHR tratadas con LGF.

Producción del radical anión superóxido en CML en cultivo. La tinción con DHE en los cultivos de CML se localizó en el citoplasma (Figura 24) por lo que la cuantificación se realizó en base a la intensidad de fluorescencia como medida de la producción basal de anión superóxido.

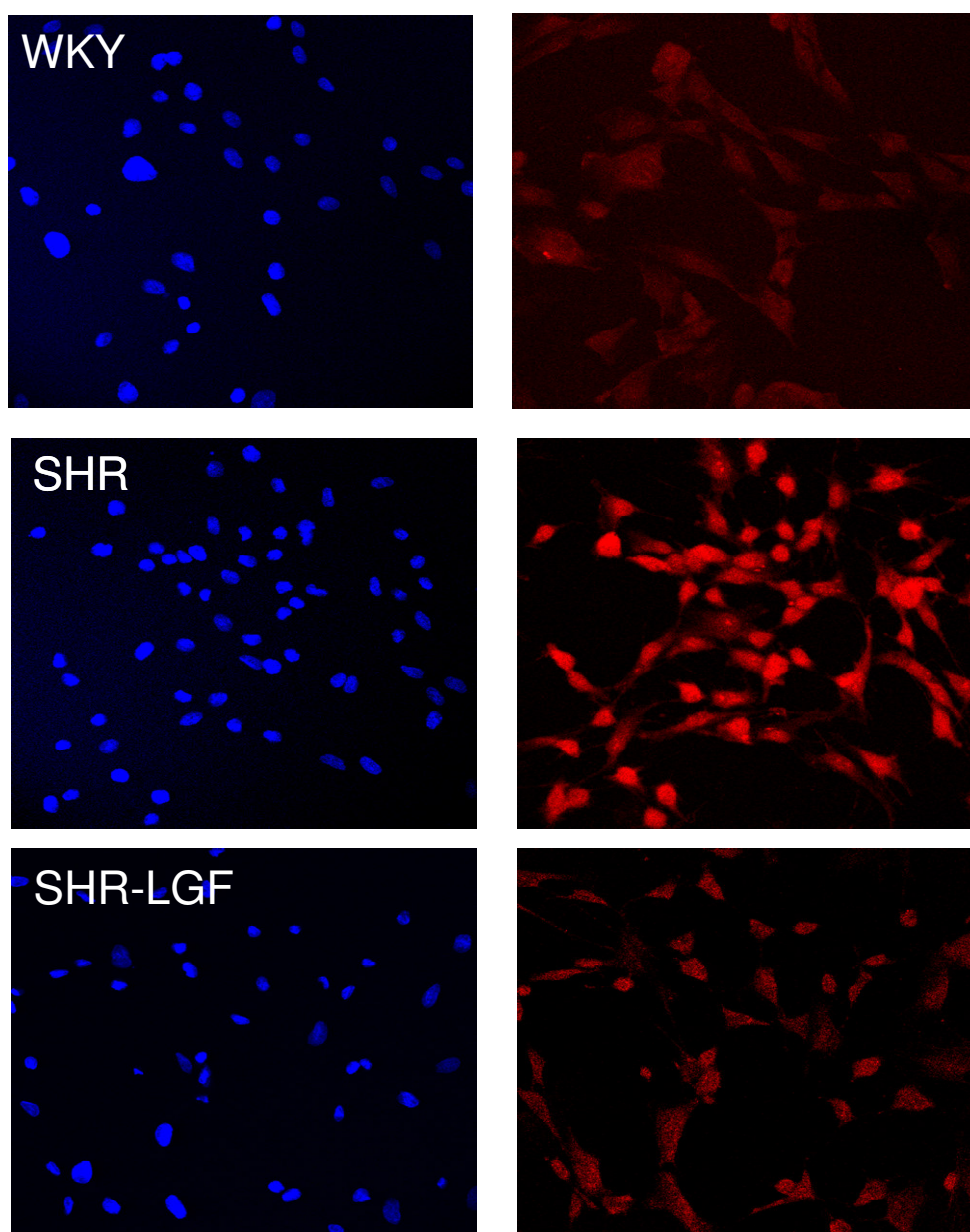


Figura 24. Tinción con el colorante nuclear DAPI (excitación 364 nm/ emisión a 461 nm, azul) y DHE (radical anión superóxido, excitación 488 nm/ emisión 590 nm, rojo) en CML procedentes de ratas WKY, SHR y SHR tratada con LGF (SHR-LGF). Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal de fluorescencia Leica con un objetivo de x20.

La fluorescencia media de los cultivos de ratas SHR fue significativamente mayor que la de los cultivos de ratas WKY. En las células procedentes de ratas tratadas con LGF se observó una reducción significativa de la fluorescencia media con respecto a las ratas SHR sin tratar, pero no alcanzó los valores de las ratas normotensas (Figura 25).

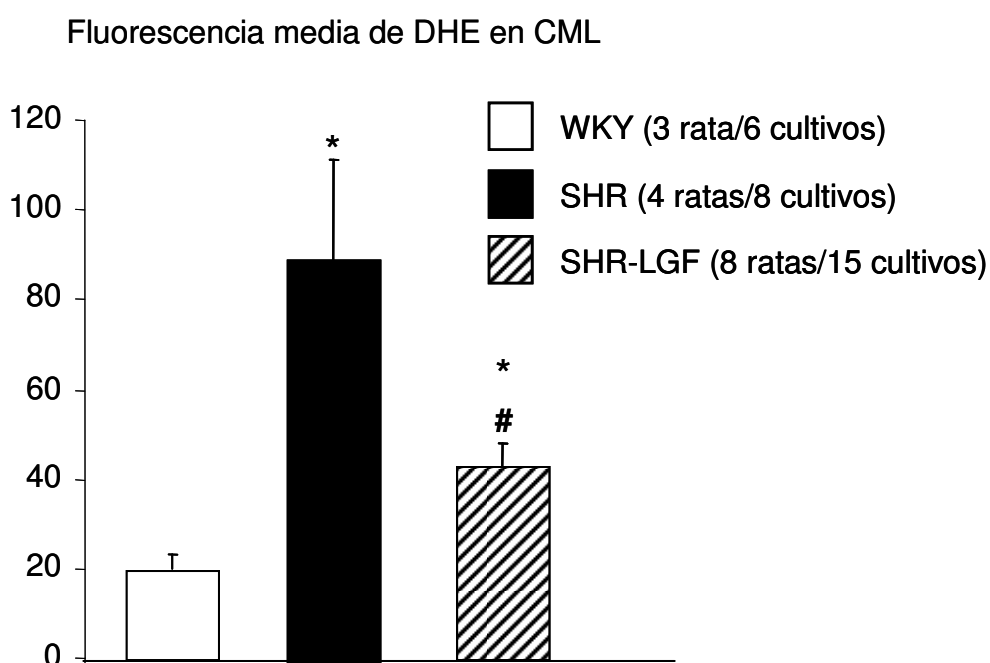


Figura 25. Fluorescencia media emitida por el DHE en CML en cultivo procedente de arterias carótidas de ratas WKY, SHR y SHR tratada con LGF. La cuantificación se realizó en imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia. Entre paréntesis el número de ratas/cultivos utilizados. * $p < 0,05$ con respecto a WKY, # $p < 0,05$ con respecto a SHR sin tratar. Análisis estadístico mediante el test de Student.

Producción del radical anión superóxido en arterias mesentéricas de resistencia (AMR). La tinción con DHE en AMR se localizó en el núcleo (Figura 26) por lo que la cuantificación de la producción basal de anión superóxido se realizó en base al número de células positivas para DHE por volumen (área de la imagen $\times 25 \mu\text{m}$ de grosor de la pared). El número de células positivas para DHE fue mayor en AMR procedentes de ratas SHR en comparación con las ratas WKY.

Las AMR de las ratas SHR-LGF mostraron un menor número de células positivas (Figura 26).

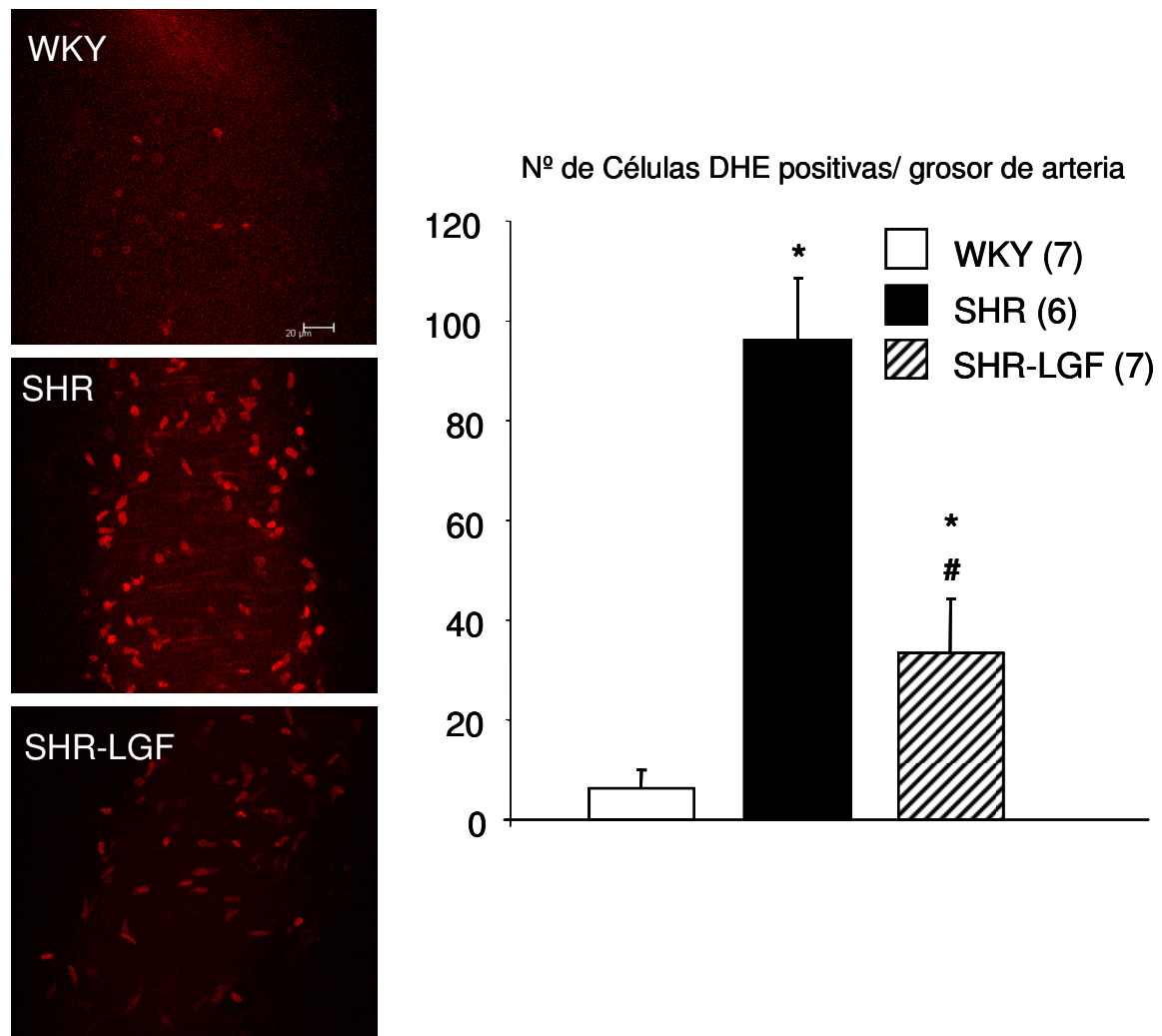


Figura 26. Tinción con DHE (excitación 488nm/emisión 590nm) en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY, SHR y SHR-tratadas con LGF (SHR-LGF). Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal de fluorescencia con un objetivo de 63x. Barra 20 µm. Análisis cuantitativo de la cantidad de células de la pared de arterias mesentéricas de resistencia positivas para DHE medidas por unidad de volumen área de la imagen x 25 micras de grosor de la pared vascular). Entre paréntesis se muestra el número de ratas utilizado. * $p < 0,05$ con respecto a WKY, # $p < 0,05$ con respecto a SHR sin tratar. Análisis estadístico mediante el test de Student.

III. REDUCCIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO POR EL TRATAMIENTO DE RATAS SHR CON LGF

1. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Como parámetro indicativo de estrés oxidativo se midió la peroxidación lipídica, por cuantificación de la concentración de MDA en plasma de ratas WKY, SHR y SHR-tratadas con LGF. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Figura 27).

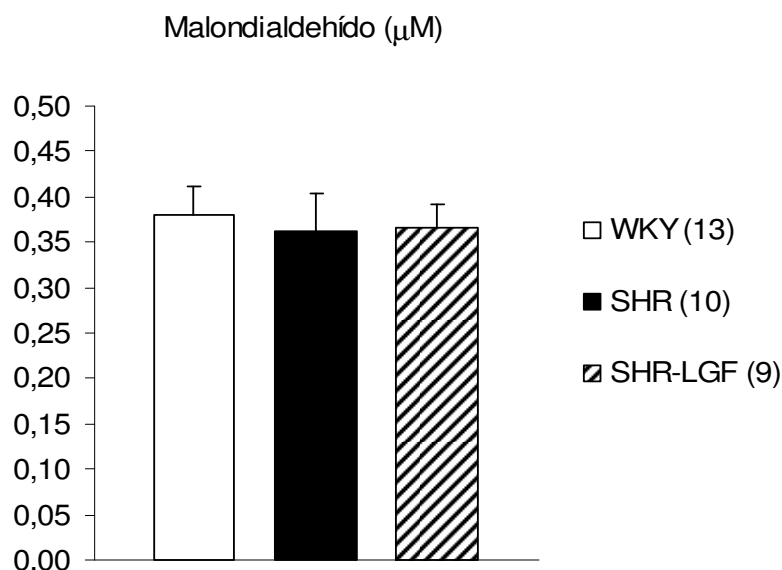


Figura 27. Concentración de malondialdehído en ratas WKY, SHR y SHR-tratadas con LGF, como parámetro de estrés oxidativo. Entre paréntesis el número de ratas utilizado. Se utilizó el test de Student para el análisis de los resultados.

2. PROTECCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO FRENTE A ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La protección del NO biodisponible, frente a la destrucción por anión superóxido se midió en segmentos vasculares mediante el DAF2-DA, un compuesto que emite fluorescencia de forma proporcional a la concentración de NO. En AMR la fluorescencia emitida por el DAF2-DA fue significativamente mayor en ratas WKY

comparadas con ratas SHR. El tratamiento con LGF aumentó los niveles de fluorescencia de forma significativa hasta valores similares a los producidos por ratas normotensas WKY (Figura 28).

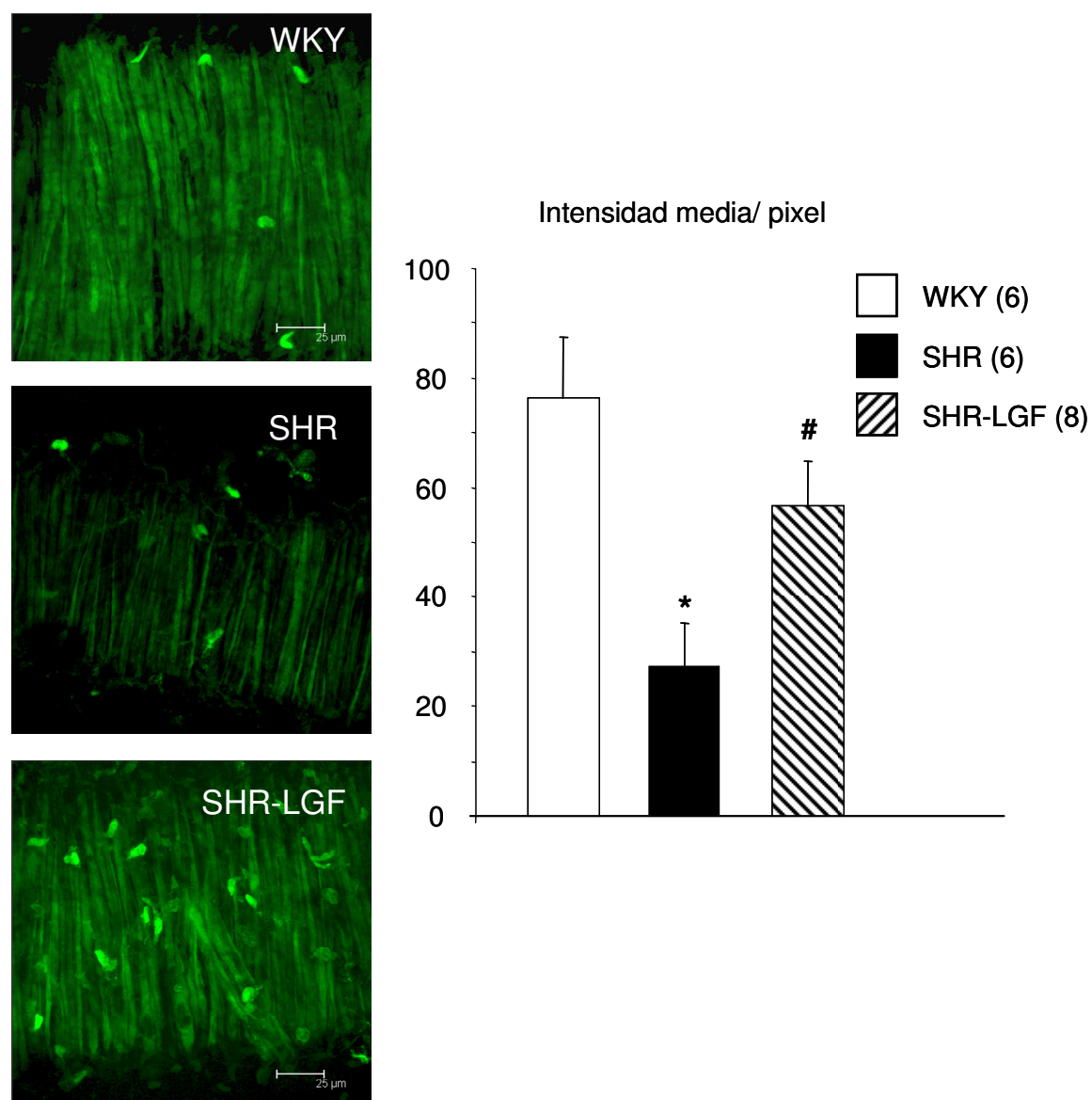


Figura 28. Medida de la biodisponibilidad de NO mediante la intensidad de fluorescencia emitida por el colorante fluorescente DAF2-DA en AMR de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con LGF (SHR-LGF). Intensidad de fluorescencia media en arterias mesentéricas de resistencia y ejemplos representativos. Las imágenes corresponden a reconstrucciones de imágenes seriadas obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia y reconstruidas en una imagen única con el programa Metamorph. Barra 20 µm. Entre paréntesis el número de ratas utilizado. * $p < 0,05$ con respecto a WKY, # $p < 0,05$ con respecto a SHR sin tratar (test de Student).

En arterias carótidas también se observó que el tratamiento con LGF aumentó la intensidad de fluorescencia emitida en comparación con las ratas SHR (Figura 29).

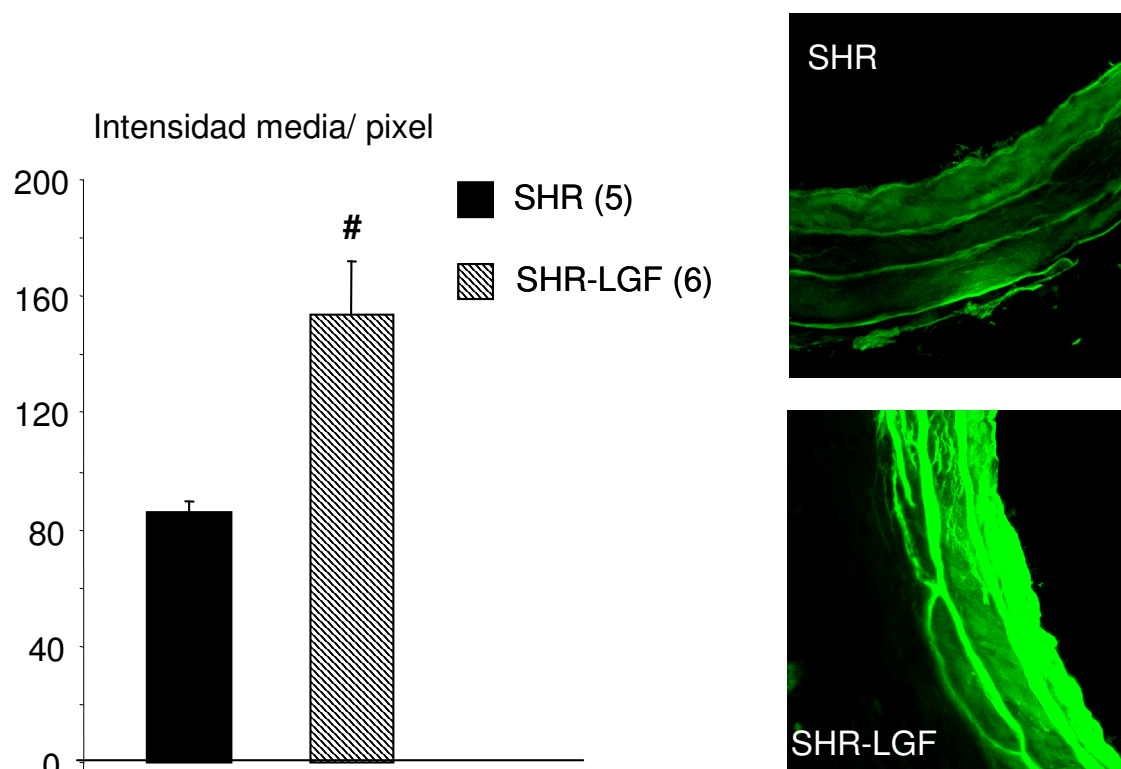


Figura 29. Media de la biodisponibilidad de NO mediante la intensidad de fluorescencia emitida por el colorante fluorescente DAF2-DA en arterias carótidas de ratas SHR y SHR tratadas con LGF (SHR-LGF). Intensidad de fluorescencia medida en las células musculares lisas de anillos de arteria carótida de ratas SHR y SHR tratada con LGF y ejemplos representativos. Las imágenes corresponden a reconstrucciones de 10 imágenes seriadas de 1 μ m de grosor, obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia y reconstruidas en una imagen única con el programa Metamorph. Barra 20 μ m. Entre paréntesis el número de ratas utilizado. # $p < 0,05$ con respecto a SHR sin tratar. Análisis estadístico con el test de Student.

Asimismo, se observó que en la mitad de arterias carótidas procedentes de ratas tratadas con LGF (3 de 6) se observó que el DAF-2 emitía fluorescencia en la adventicia. Un estudio detallado con tinción simultánea de DAF2-DA y con el colorante nuclear DAPI mostró que esta tinción estaba situada en vasa-vasorum (Figura 30A).

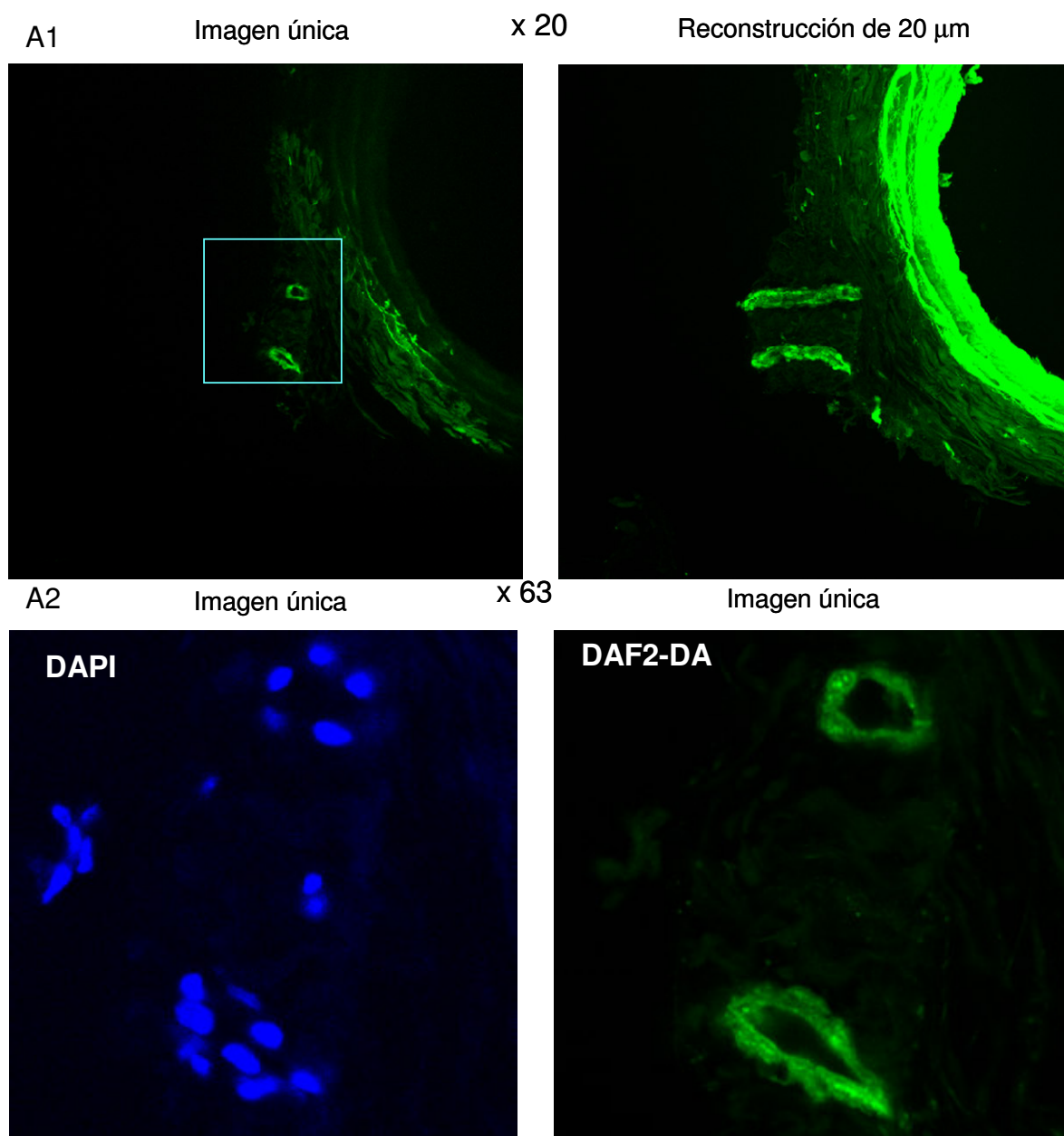


Figura 30A. Imágenes representativas de vasa-vasorum en la adventicia de una arteria carótida de rata SHR tratada con LGF. Las arterias se han teñido con el colorante nuclear DAPI (364/461nm) y DAF2-DA (488/515nm) y se han visualizado con un microscopio confocal de fluorescencia. **A1)** Anillo de arteria carótida visualizado con un objetivo de x20 a la longitud de onda de excitación del DAF2-DA (izquierda plano superior del anillo en imagen única; derecha reconstrucción de 20 planos consecutivos del anillo). **A2)** ampliación de la región enmarcada en la figura superior visualizada con un objetivo de x63 (izquierda tinción con el colorante nuclear DAPI y derecha tinción con DAF2-DA).

IV. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE RATAS SHR CON LGF SOBRE EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE ENDÓGENO GLUTATIÓN

1. CUANTIFICACIÓN DEL GLUTATIÓN TOTAL

Mediante un ensayo espectrofotométrico se determinó la concentración de glutatión total en plasma de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con LGF. Los resultados se analizaron por el método del punto final (a los 5 minutos), que se basa en la interpolación de la absorbancia de cada muestra de plasma en la ecuación de la recta de una curva patrón (gráfica de la absorbancia a 405 nm frente a la concentración de los estándares a un tiempo determinado). El glutatión oxidado no se pudo medir ya que en plasma la concentración no es detectable con este método.

El resultado obtenido fue de un aumento significativo en la concentración de glutatión total de las ratas hipertensas SHR tratadas con LGF con respecto a las ratas normotensas WKY. Se observó un aumento en los niveles de glutatión total de las ratas hipertensas respecto las normales, aunque no fue estadísticamente significativo (Figura 31).

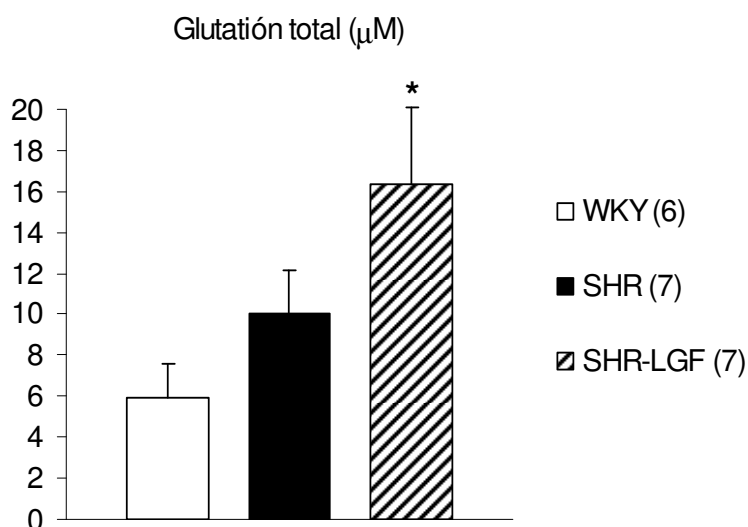


Figura 31. Cuantificación de glutatión total en plasma de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con LGF (SHR-LGF). Entre paréntesis el número de ratas utilizado. * $p < 0,05$ con respecto a las ratas WKY. Análisis estadístico con el test de Student.

2. ACTIVIDAD GLUTATIÓN REDUCTASA

La actividad de la enzima antioxidante endógena glutatión reductasa, fue determinada mediante el seguimiento espectrofotométrico de la cinética de la reacción de desaparición del cofactor NADPH que se consume en presencia del GSSG y de la GR, que actúa como catalizador de la reacción. Los cálculos de la actividad de la GR se realizaron a partir de la pendiente que se obtuvo de la disminución de la absorbancia relativa a la consumición del NADPH frente al tiempo. La actividad GR determinada en los tres grupos anteriormente mencionados mostró una tendencia a aumentar en las ratas SHR con respecto a las WKY, y el tratamiento con el LGF también parece que aumentó la GR, aunque no fue estadísticamente significativo (Figura 32).

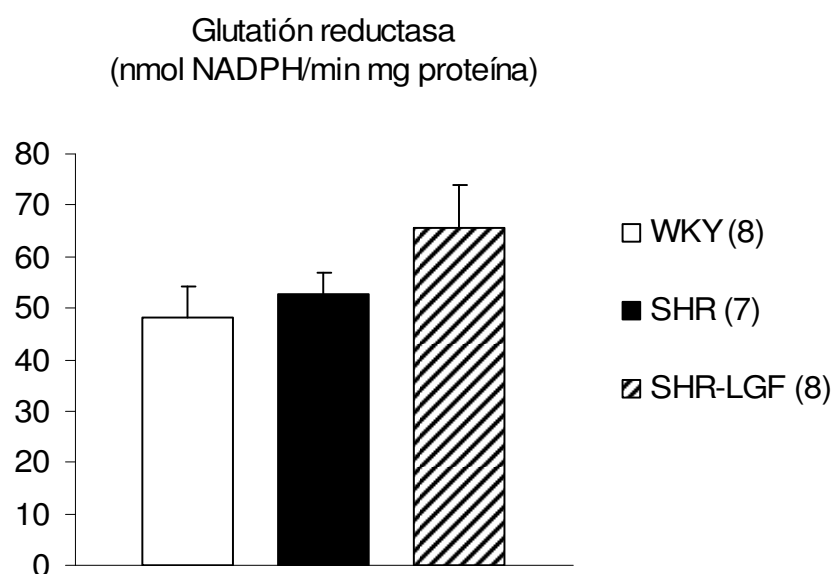


Figura 32. Determinación de la actividad glutatión reductasa en ratas WKY, SHR y SHR tratadas con LGF (SHR-LGF). Entre paréntesis el número de ratas utilizado. Análisis estadístico con el test de Student.

DISCUSIÓN

Actualmente hay un enorme interés en el desarrollo de estrategias antioxidantes para el tratamiento y la prevención de la enfermedad cardiovascular. Este interés se basa en el hecho de que el estrés oxidativo está implicado en los procesos de daño de la pared vascular asociados a la patología cardiovascular. En particular, en relación a la hipertensión se conoce que el estrés oxidativo es uno de los elementos centrales de las alteraciones en la estructura y función vascular (Irani, 2000; Touyz y Schiffrin, 2001; Fortuño y cols., 2005, Weber, 2005). Estas alteraciones se han descrito en pacientes hipertensos y también en los modelos animales de hipertensión, particularmente en la rata SHR, animal que, por su similitud con la hipertensión esencial humana, se ha utilizado como modelo para probar la efectividad de nuevos fármacos.

La administración del LGF a ratas SHR ejerce potentes acciones antifibróticas y de mejora de la función vascular (Somoza y cols., 2006). Puesto que el estrés oxidativo está implicado en los fenómenos de remodelado y fibrosis vascular, así como en la disfunción endotelial (Irani, 2000; Touyz y Schiffrin, 2001; Fortuño y cols., 2005; Weber, 2005), la hipótesis de esta Tesis Doctoral es que el LGF puede ejercer sus acciones regenerativas, al menos en parte, mediante mecanismos de protección frente a radicales libres. En este trabajo se ha evaluado la capacidad del LGF para eliminar en medio acuoso, (*in vitro*), radicales muy tóxicos para la célula como son los radicales anión superóxido, hidroxilo y peroxilo. Esta aproximación experimental simula los posibles efectos del LGF como molécula circulante en el plasma. Por otra parte, hemos evaluado el potencial efecto antioxidante del tratamiento con LGF en ratas SHR, y si éste está relacionado con un aumento de la capacidad antioxidante endógena y/o con una disminución de la producción de radicales libres. Finalmente se ha evaluado la capacidad protectora del tratamiento con LGF en ratas SHR frente al daño producido por el estrés oxidativo.

El LGF se ha caracterizado -tanto en humanos como en ratas- como un complejo de seroalbúmina y bilirrubina unidas con un enlace covalente, y con una

conformación característica que le confiere su actividad biológica. El LGF es equivalente a lo que se conoce como bilirrubina δ o biliproteína (Díaz-Gil y cols., 1987a; 1988; 1989).

Los componentes de la molécula de LGF: albúmina y bilirrubina, poseen por sí mismos actividad antioxidante. En cuanto a la capacidad antioxidante de la albúmina, se ha demostrado que -debido a su abundancia- ejerce más del 70% de la actividad antioxidante en el plasma (Bourdon y Blache, 2001). Esta actividad se debe, en parte, a su capacidad para unirse a determinadas moléculas. Por ejemplo puede ligar metales, como el hierro y el cobre que están implicados en la formación de radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton (Roche y cols., 2008). Otro de los efectos antioxidantes de la albúmina se debe a su capacidad de unión a ácidos grasos libres la cual está asociada a un incremento en el riesgo de mortalidad cardiovascular (Zoccali y cols., 2005). En este sentido se ha demostrado que la toxicidad por niveles elevados de ácidos grasos en plasma es mayor si hay una deficiencia de albúmina (Roche y cols., 2008).

Por otro lado, la albúmina puede ejercer su capacidad antioxidante por la presencia en su molécula de aminoácidos -cisteína, triptófano, tirosina, histidina, o metionina- que poseen un átomo de hidrógeno en su cadena lateral que pueden ceder fácilmente (Aliaga y Lissi, 2000; Nadal y cols., 2007). Se ha demostrado recientemente que algunas propiedades antioxidantes de la albúmina dependen del mantenimiento de la cisteína-34 en forma reducida y que sustancias oxidantes como el peróxido de hidrógeno, el peroxinitrito y el malondialdehído pueden oxidarla, reduciendo así parte de las acciones antioxidantes de la misma (Quinlan y cols., 2005; Oetti y cols., 2008; Suji y Sivakami, 2008). Es de destacar que entre las sustancias que son capaces de proteger a la albúmina de dicha oxidación del grupo cisteína, las más importantes son la bilirrubina y el NO (Neuzil y Stocker, 1994; Rubbo y cols., 1995; Quinlan y cols., 2005).

En cuanto a la bilirrubina también existen evidencias epidemiológicas que indican que bajos niveles de bilirrubina en suero se asocian con un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular (Mayer, 2000; Lin y cols., 2006; Perlstein y cols., 2008). El hecho de que la bilirrubina y compuestos relacionados –biliverdina y CO- posean propiedades antioxidantes (Neuzil y Stocker, 1994; Bélanger y cols., 1997; Stocker, 2004; McLean y cols., 2007), ha promovido estudios sobre cómo estimular la producción de bilirrubina mediante la activación de la hemoxigenasa como potencial terapia antioxidante (Clark y cols., 2000; Foresti y cols., 2001; Adin y cols., 2005; Abraham y cols., 2007; Chung y cols., 2008). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la bilirrubina no es soluble en agua y además es un compuesto potencialmente tóxico, por lo que circula unida a la albúmina o conjugada con ácido glucurónico. Por lo tanto, las capacidades antioxidantes y cardioprotectoras de la bilirrubina podrían ser atribuidas a alguna de sus formas conjugadas o combinadas con la albúmina, como por ejemplo el LGF.

Se conoce que los compuestos de albúmina -bilirrubina con enlaces no covalentes tienen efectos antioxidantes en el plasma (Chepelev y cols., 2006; McLean y cols., 2007); pero dichos efectos no serían muy duraderos ya que estos complejos se podrían disociar debido a la naturaleza del enlace, y la bilirrubina se excretaría rápidamente. Sin embargo, el LGF -debido a sus características moleculares (conformación-enlace covalente)- tiene una vida media prolongada (Díaz-Gil y cols., 1987a), habiéndose demostrado que la biliproteína – LGF-, posee una semivida plasmática igual a la de la albúmina (Weiss y cols., 1983; Gautam y cols., 1984; Reed y cols., 1988; Higashijima y cols., 1996). Por esta razón es muy interesante el estudio de los efectos antioxidantes del LGF como molécula endógena circulante en plasma.

I. CAPACIDAD DEL LGF PARA ELIMINAR RADICALES LIBRES EN MEDIO ACUOSO

En primer lugar se ha probado la capacidad del LGF para actuar como captador de diversos radicales libres sintéticos y biológicos, comparando su efectividad frente a el Trolox -análogo de la vitamina E- que es un antioxidante de referencia habitualmente utilizado para estudiar compuestos potencialmente antioxidantes. Puesto que el LGF es un complejo de albúmina –bilirrubina con enlace covalente también se ha comparado su efectividad frente a sus elementos constituyentes seroalbúmina y bilirrubina, ya que ambos poseen actividad antioxidante *per se* y unidos en complejos no covalentes (McLean y cols., 2007; Stocker y cols., 2004; Roche y cols., 2008). Hay que tener en cuenta que, en medio acuoso a pH fisiológico 7,4, la bilirrubina no es soluble ya que tiene una estructura cerrada que no le permite actuar como donador de electrones (Chepelev y cols., 2006). Para poder determinar el efecto de la bilirrubina como antioxidante, ésta fue solubilizada en medio ligeramente alcalino, lo que genera la forma abierta que permite la transferencia de electrones. Esta es la forma en la que parece actuar la bilirrubina cuando está unida a la albúmina mediante enlace no covalente (Chepelev y cols., 2006; McLean y cols., 2007).

En primer lugar se comprobó la capacidad del LGF para eliminar un radical sintético, el catión radical ABTS. Este ensayo se ha utilizado ampliamente para estudiar la capacidad como antioxidantes potenciales de aminoácidos, péptidos, y seroalbúmina (Re y cols., 1999; Aliaga y cols., 2000), así como del plasma y de homogenizados de tejidos (Bompadre y cols., 2004). La cinética de la reacción fue similar para la bilirrubina y el LGF y diferente al Trolox. Este compuesto describió únicamente una cinética rápida, mientras que el LGF y la bilirrubina presentaron una cinética bifásica con una fase rápida inicial seguida de una más lenta. Esto indica que el Trolox es una molécula con una gran capacidad antioxidante pero que se consume rápidamente, mientras que la bilirrubina y el LGF poseen un mecanismo de acción más lento. Comparando los potenciales antioxidantes de

los distintos compuestos utilizados -en valores de peso:volumen- la albúmina presentó poca capacidad comparada con el LGF, la bilirrubina y el Trolox. Además, éstos últimos ejercieron su capacidad antioxidante de forma lineal y concentración dependiente, mientras que la albúmina sólo fue efectiva a concentraciones elevadas y de forma no lineal. Aunque en peso:volumen la bilirrubina fue el compuesto con mayor capacidad para eliminar el catión ABTS, si se tiene en cuenta el peso molecular de la bilirrubina, el Trolox y el LGF, es el LGF el compuesto con una mayor capacidad antioxidante, ya que es capaz de eliminar el radical libre con un número mucho menor de moléculas.

En cuanto a los mecanismos de acción antioxidante, se han descrito dos tipos: uno es por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), y el otro por transferencia de electrones (SET). Se ha sugerido que la albúmina puede ejercer, al menos parte de sus acciones antioxidantes por cesión de un átomo de hidrógeno desde aminoácidos como cisteína, triptófano, tirosina, histidina, o metionina (Aliaga y Lissi, 2000; Nadal y col., 2007). En cambio la bilirrubina actúa mediante el segundo mecanismo SET (Laguerre y cols., 2007). Es posible que el LGF al contener albúmina y bilirrubina en su molécula pueda ejercer efectos antioxidantes por ambos mecanismos. También es posible que la bilirrubina actúe como protector de la albúmina, impidiendo la oxidación de la cisteína-34 (Quinlan y cols., 2005), lo que contribuiría a la mayor capacidad antioxidante del LGF.

La peroxidación lipídica se ha implicado en numerosos procesos inflamatorios relacionados con la enfermedad cardiovascular (Hogg y Kalyanaraman, 1999). Uno de los aspectos más deletéreos de la peroxidación lipídica es que es un proceso en cadena y, una vez iniciado, una molécula puede actuar de oxidante de muchas otras. Para determinar la capacidad de los distintos compuestos para eliminar radicales peroxilo se utilizó el método ORAC, que permite estudiar, con alta especificidad, la capacidad de un compuesto como antioxidante en sistemas fisiológicos (Prior y Cao, 1999; Prior y cols., 2005). El LGF mostró una actividad antioxidante concentración-dependiente y, tal y como

muestran las áreas bajo la curva, fue mayor que la presentada por la albúmina y la bilirrubina, incluso sin tener en cuenta el peso molecular. De forma similar, comparando diferentes complejos de albúmina-bilirrubina y bilirrubina como sustancias capaces de proteger a miocitos frente al daño generado por anión peroxilo, se ha demostrado que el compuesto más efectivo fue la bilirrubina δ (Wu y cols., 1991), que es el mismo compuesto que el LGF. En cambio la seroalbúmina apenas presentó capacidad para eliminar radicales peroxilo. Estos datos sugieren que la unión covalente entre la albúmina y la bilirrubina genera un cambio conformacional en la molécula que le confiere sus propiedades biológicas, en particular su capacidad antioxidante. Esto se ha demostrado previamente con otras acciones del LGF, como su efecto como mitógeno en células hepáticas, el cual no está presente en sus constituyentes bilirrubina o albúmina (Díaz-Gil y cols., 1987a).

En cuanto a la cinética de actividad antioxidante frente a radicales peroxilo, el Trolox mostró un retraso en la caída de fluorescencia producida por el generador de radicales. Este tipo de cinética es característica de algunos antioxidantes -como el tocoferol- que actúan mediante autooxidación y rotura de la cadena de oxidación, interfiriendo así en la fase de propagación. En cambio el LGF y la bilirrubina no presentaron esta primera fase de retraso en la caída de fluorescencia. Esto se asemeja a los antioxidantes que actúan en fase acuosa y que inhiben la peroxidación lipídica bloqueando la fase de iniciación (Goupi y cols., 2007; Laguerre y Laguerre y cols., 2007).

El LGF también presentó actividad antioxidante frente al radical hidroxilo de forma concentración dependiente. El radical hidroxilo es otro radical libre con gran capacidad de daño a diversos materiales biológicos (Huie y cols., 1999) y que recientemente ha sido implicado en las alteraciones de la función vascular en la rata SHR (Deshmuk y cols., 2007). El LGF y la bilirrubina mostraron una capacidad similar para captar radicales hidroxilo, mientras que la albúmina mostró una capacidad antioxidante mucho menor. Por otra parte, tanto el LGF

como la bilirrubina mostraron una cinética lineal, lo que indica que, al menos en nuestras condiciones experimentales, el paso limitante de la reacción es el ataque inicial del grupo OH (Halliwell y cols., 1987). Al igual que en los casos anteriores, hay que resaltar el hecho de que, si se tiene en cuenta el peso molecular de la bilirrubina y el LGF, es necesario un número de moléculas de LGF muy inferior para obtener un efecto similar. Estos resultados y los anteriormente discutidos del efecto antioxidante frente a radicales peroxilo, refuerzan la idea de que la conformación de la molécula de LGF proporciona una mayor capacidad antioxidante que la que presentan sus compuestos constituyentes.

El anión superóxido es uno de los radicales libres de oxígeno centrales en la enfermedad cardiovascular, ya que, además de producir efectos deletéreos directos sobre la pared vascular (Taniyama y Griendling, 2003), es un radical libre implicado en la formación de otras especies reactivas. Uno de los efectos importantes del anión superóxido es su interacción con el NO, lo que reduce su biodisponibilidad (Kerr y cols., 1999; Hamilton, 2002; Calo y cols., 2005). Estos efectos son deletéreos por dos razones; en primer lugar, por la importancia que el NO tiene en la fisiología vascular inhibiendo procesos proliferativos y manteniendo un adecuado tono vascular y una superficie no trombogénica (Sudano y cols., 2006; Pechanova y Simko., 2007). En segundo lugar, la interacción entre anión superóxido y NO genera peroxinitrito, una especie altamente reactiva que participa en la peroxidación lipídica (Hogg y Kalyanaraman, 1999). Se estudió el efecto del LGF en medio acuoso para proteger al NO de la destrucción mediante anión superóxido. Para ello se mimetizó una situación de estrés oxidativo añadiendo pirogalol en el baño de órganos. Este compuesto en nuestras condiciones experimentales (a 37°C y en condiciones de saturación de oxígeno) se ha demostrado que genera anión superóxido (Marklund y Marklund, 1974). La generación del anión se comprobó por la capacidad del pirogalol en reducir la relajación a ACh, que en las arterias de conducción es dependiente de NO (Rees y cols., 1990). El efecto deletéreo del pirogalol 1 µM fue contrarrestado por el LGF a una concentración mucho menor,

del orden nM. Asimismo, se comprobó que la enzima SOD y el Tirón (análogo permeable de dicha enzima), producían también efectos protectores a concentraciones habitualmente utilizadas en experimentos de reactividad vascular para bloquear el efecto de anión superóxido (Reyes-Toso y cols., 2007). Hay que destacar que el Tiron (10 mM) ejerció su efecto antioxidante a una concentración mucho mayor que el LGF (0,3 nM).

Los resultados *in vitro* anteriormente discutidos, indican que el LGF es una molécula capaz de eliminar varios radicales libres en medio acuoso. Estos resultados nos sugieren que el LGF circulante en sangre podría actuar como una barrera antioxidante endógena, eliminando radicales libres producidos por la pared vascular, de forma similar a otros sistemas de defensa antioxidante como pueden ser el glutatión, el ácido úrico, la melatonina, así como algunas vitaminas. Además, el estudio de la cinética por el ensayo del ABTS demostró que el LGF actúa de forma más lenta en comparación con el antioxidante de referencia Trolox (análogo de la vitamina E) que se consume en segundos. Esto indicaría que el LGF podría comportarse como una segunda línea de defensa, cuando otros sistemas de defensa antioxidante de actuación más rápida se han consumido, lo que podría ser relevante en situaciones de estrés oxidativo en las que hay una producción mantenida de radicales libres.

También se debe destacar que el LGF tiene una capacidad antioxidante muy potente teniendo en cuenta su peso molecular. Cuando se compara con sus componentes, los resultados indican que con muy pocas moléculas, el LGF tiene una capacidad para eliminar radicales libres mucho mayor que la bilirrubina y la albúmina. Estos resultados indican que a concentraciones molares muy bajas en plasma, el LGF podría ejercer efectos antioxidantes apreciables. El LGF parece ser indetectable en el plasma de individuos o ratas sanos y que su concentración aumenta significativamente en situaciones de daño hepático o hepatobiliar (Weiss y cols., 1983; McDonagh y cols., 1984; Díaz-Gil y cols., 1986a y 1986b). En el contexto de la enfermedad vascular es importante resaltar que situaciones como

la hipertensión y la aterosclerosis cursan con inflamación y se ha demostrado que las citocinas inflamatorias pueden producir colestasis, con la consecuente elevación de la bilirrubina en plasma (Trauner y cols., 1999). Esto significaría que el LGF podría formarse en estas circunstancias y ejercer como molécula protectora endógena. Como hemos comentado anteriormente, tanto la bilirrubina como los complejos albúmina-bilirrubina poseen actividad antioxidante (Stocker, 2004; McLean y cols., 2007). El potente efecto que el LGF es capaz de ejercer en medio acuoso, junto con el hecho de que el LGF es un compuesto covalente de albúmina-bilirrubina, hace que éste se comporte -desde el punto de vista cinético como la albúmina-, es decir por sus características de tamaño y cargas no se filtra a la orina y tiene una vida media en plasma de 20 días (Greeger y Windhorst, 1996). Estos hechos sugieren que, posiblemente, el LGF es el complejo de albúmina-bilirrubina circulante en sangre con propiedades antioxidantes más importante, particularmente en situaciones de daño inflamatorio.

En relación con los efectos encontrados en la molécula de LGF como antioxidante, es de destacar el gran interés que en los últimos años ha generado la bilirrubina y la enzima hemoxigenasa (HO) -que participa en la vía de síntesis de la bilirrubina- en el contexto de la enfermedad cardiovascular, con más de 200 revisiones sobre el tema (entre las más recientes Ollinger y cols., 2007; Schwertner HA, Vitek, 2008; Parfenova H, Leffler, 2008; Chung y cols., 2008) y la posibilidad de utilizar herramientas farmacológicas o genéticas para estimular la HO y aumentar la producción de bilirrubina.

II. EFECTO *IN VIVO* DEL LGF

El hecho de que la hipertensión arterial y la enfermedad cardiovascular cursen con estrés oxidativo ha potenciado la investigación del efecto de sustancias antioxidantes como tratamiento de la patología cardiovascular. Entre las estrategias que se han considerado se incluyen los tratamientos con suplementos antioxidantes como vitaminas o compuestos polifenólicos o la incorporación de dietas ricas en sustancias antioxidantes (Ceriello y cols., 2008). Otra estrategia terapéutica es la estimulación de la capacidad antioxidante endógena o la reducción de la producción de radicales libres (Hamilton y cols., 2004; Delles y cols., 2006; Paravicini y Touyz, 2008).

Se ha constatado que las dietas antioxidantes en las que se incrementa el consumo de frutas y verduras reducen la presión arterial, y también incrementan la capacidad antioxidante en plasma (Appel y cols., 1997; Ceriello, 2008; Paravicini y Touyz 2008). Sin embargo, los efectos de suplementos con antioxidantes (vitaminas C, E, carotenoides) han sido controvertidos. Aunque algunos ensayos con grupos pequeños de individuos han resultado positivos, la mayoría de los ensayos clínicos realizados con un elevado número de pacientes, para estudiar el efecto de vitaminas antioxidantes como tratamiento de la hipertensión y de enfermedades cardiovasculares, en general han sido negativos. Lo mismo ha ocurrido con ensayos en los que se utilizaban micronutrientes antioxidantes como suplementos y se ha sugerido que estos tratamientos pueden llegar a ser incluso deletéreos (Jialal y Devaraj, 2003; Paravicini y Touyz 2008; Ceriello, 2008). Una posible explicación es que en las dietas ricas en frutas y verduras hay una mezcla de antioxidantes que pueden actuar en cadena de forma más eficiente llegando a formar una especie no reactiva. Sin embargo, la suplementación con una sola vitamina o micronutriente pueden no completar la cadena e incluso puede llegar a convertirse en una especie oxidante (Ceriello, 2008; Paravicini y Touyz 2008). La controversia generada por estos estudios con

suplementos ha potenciado otra aproximación terapéutica: la inhibición de los sistemas de generación de radicales libres de oxígeno -particularmente el anión superóxido- por los sistemas enzimáticos endógenos (Touyz, 2005; Cai y cols., 2003; Cave y cols., 2006; Inagi, 2006; Delles, 2008; Pavaricini y Touyz, 2008).

Basados en estos estudios, se planteó como otro objetivo de esta Tesis analizar el posible efecto antioxidante de un tratamiento de ratas SHR con LGF. Se determinó, por una parte, la capacidad del tratamiento para inhibir la producción de radicales libres de oxígeno en la pared vascular y, por otra, la capacidad del LGF para aumentar las defensas antioxidantes endógenas en plasma, mediante el estudio del sistema glutatión.

1. PRODUCCIÓN DE RADICAL ANIÓN SUPERÓXIDO

En primer lugar se estudió el efecto del tratamiento con LGF sobre la producción del radical anión superóxido, que es la especie reactiva central en la enfermedad cardiovascular y que puede dar lugar a otras especies reactivas más deletéreas (Hogg y Kalyanaraman, 1999). La cantidad del radical anión superóxido determinada en arteria carótida medida mediante quimioluminiscencia, no fue diferente entre las ratas normotensas y las hipertensas. El tratamiento con LGF tendió a reducir los niveles de anión superóxido aunque no alcanzó significancia estadística. El método de quimioluminiscencia basado en la lucigenina ha sido muy utilizado para estudiar la producción de radicales libres en el tejido vascular. Aunque este método es específico y sensible (Guzik, 2005), la cantidad de radical anión superóxido que se produce en situación basal, puede encontrarse por debajo de los límites de detección. La capacidad del sistema para detectar poca cantidad de anión superóxido parece depender del lecho vascular estudiado. Así, en arterias mesentéricas (Alvarez de Sotomayor y cols., 2007; González y cols., 2008) y aorta de ratas SHR (Wu y cols., 2001) se ha demostrado que la producción basal es mayor en comparación con la de arterias de ratas WKY. Por el contrario, en arterias basílicas no pueden ser detectadas diferencias entre

cepas y en la arteria cerebral media los niveles basales de anión superóxido están incluso disminuidos (González y cols., 2008). Esto puede estar relacionado con la capacidad de los sistemas eliminadores del anión superóxido, particularmente la SOD, los cuales parece ser elevados en las arterias cerebrales de SHR (Paravicini y cols., 2004) y en cambio, son bajas en aorta de ratas SHR (Wu y cols., 2001).

Un método alternativo y más sensible es la detección del radical anión superóxido mediante el dihidroetidido. Este compuesto en presencia del radical anión superóxido se transforma en bromuro de etidio que se intercala en el ADN y se detecta a la longitud de onda de 488 – 515 nm (Arribas y cols., 2007). Este método permite, mediante microscopía confocal, localizar en células y en arterias intactas, núcleos positivos para el DHE, lo que es proporcional a la cantidad de radical anión superóxido producido (Arribas y cols., 2007; González y cols., 2008). Se utilizaron arterias mesentéricas de resistencia, ya que pueden visualizarse mediante microscopía confocal sin realizar cortes histológicos. Las arterias de SHR presentaron mayor número de células positivas para el DHE que las WKY, lo que indica una mayor cantidad del radical anión superóxido en situación basal. El tratamiento con LGF redujo el número células positivas para el DHE. Estos resultados indican que el LGF inyectado en la rata es capaz de señalizar sobre las células de la pared vascular y reducir la producción de radical anión superóxido.

Estos resultados se corroboraron en células de músculo liso procedentes de cultivos de ratas WKY, SHR y SHR-LGF. La caracterización mediante tinción de diversos filamentos en estos cultivos celulares, demostró que presentaban tinción positiva para α -actina de músculo liso y para el filamento intermedio desmina, pero no presentaron tinción para vimentina –que tiñe fibroblastos o CML en fenotipo inmaduro sintético-. Estos datos indican que las células de los cultivos utilizados son CML y pertenecen al fenotipo maduro. En las CML procedentes de ratas SHR se observó una mayor cantidad basal de radical anión superóxido en comparación con las células procedentes de las ratas WKY – al igual que se ha

demostrado previamente en aorta (Wu y cols., 2001)- y una reducción significativa en las CML de ratas SHR tratadas con LGF. Estas células se han extraído de animales tratados o controles, y se han mantenido como cultivos primarios. El hecho de que los efectos sobre la producción de radical anión superóxido se mantengan tras la extracción de las células, indica que se ha producido una señalización sobre los mecanismos productores, y que el LGF, además de eliminar radicales, produce otro tipo de efectos antioxidantes. En la pared vascular la enzima más importante implicada en la producción de radical anión superóxido es la NAD(P)H oxidasa y la SOD es el principal mecanismo enzimático para su degradación. Se ha demostrado que la NAD(P)H oxidasa se encuentra sobreexpresada en vasos de ratas hipertensas SHR y también en pacientes con hipertensión y otras patologías cardiovasculares (Griendling y cols, 2000; Zalba y cols., 2001; Fortuño y cols., 2005).

Para confirmar si el efecto del LGF estaba relacionado con la NAD(P)H oxidasa se midió la actividad de esta enzima en arterias carótidas de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con LGF. En los tres grupos experimentales, la estimulación con el sustrato NADH aumentó significativamente la producción de cuantos de luz, los cuales fueron significativamente bloqueados por el análogo soluble de la SOD, Tiron, lo que indica que la elevación de la quimioluminiscencia se debe a la generación del radical anión superóxido. Asimismo, la preincubación con el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, DPI, redujo significativamente la producción estimulada de radical anión superóxido, lo que indica la implicación de dicha enzima en la respuesta. Este aumento fue mayor en ratas SHR en comparación con la rata WKY y fue significativamente reducida en arterias de ratas tratadas con LGF. Estos resultados son similares a los observados en ratas SHR-stroke prone tras el tratamiento diario con vitaminas C y E durante 6 semanas (Chen y cols., 2001).

La capacidad del tratamiento de las ratas SHR con LGF de reducir los niveles de anión superóxido mediados por la NAD(P)H oxidasa es relevante

dentro del contexto de los nuevos tratamientos antihipertensivos encaminados a inhibición de este sistema enzimático (Touyz, 2005; Cai y cols., 2003; Cave y cols., 2006; Inagi, 2006; Delles, 2008; Pavaricini y Touyz, 2008). En animales de experimentación ya se han ensayado con éxito diversas estrategias cuya diana es la sobreexpresión de la NAD(P)H oxidasa, sin embargo en la actualidad, problemas de toxicidad y especificidad de los compuestos ensayados hace que no cumplan todavía los criterios para su utilización en los seres humanos (Delles y cols., 2008).

Hoy en día los únicos tratamientos capaces de producir una inhibición de la enzima NAD(P)H oxidasa en pacientes son los antihipertensivos relacionados con el sistema renina angiotensina (bloqueantes de receptores de angiotensina II y del enzima conversor de angiotensina). Estos antihipertensivos clásicos inicialmente se utilizaron para reducir los niveles de presión arterial y posteriormente se comprobó sus efectos como antifibróticos (Schiffrin, 2004). Más recientemente se ha puesto de manifiesto que la acción de estos agentes puede estar mediada por un mecanismo de acción antioxidante (Paravicini y Touyz, 2008). Es de destacar que los efectos de estos fármacos sobre la función y la estructura vascular se asemejan a los observados en el estudio de Somoza y cols de 2006 en ratas SHR tratadas con LGF, en el que se describió una reducción de la fibrosis vascular y la mejora de la disfunción endotelial. En este sentido, es relevante que el LGF hace los mismos efectos que los inhibidores del Sistema Renina Angiotensina, pero en un tiempo mucho más corto de tratamiento (12 días con 4 inyecciones frente a varios meses). El hecho de que el LGF sea un compuesto endógeno y realice los mismos efectos antioxidantes indica su potencial terapéutico.

2. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE RATAS SHR CON LGF SOBRE EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE GLUTATIÓN

En segundo lugar se estudió el efecto del tratamiento con LGF sobre el sistema de defensa antioxidante endógeno glutatión. La concentración de glutatión total tendió a aumentar en el plasma de ratas SHR con respecto a las ratas normotensas WKY, aunque no alcanzó significancia estadística. Por otra parte, el glutatión oxidado no pudo medirse con el método utilizado, ya que las concentraciones de glutatión oxidado en plasma son muy pequeñas. La actividad de la enzima regeneradora de glutatión reducido, la glutatión reductasa no fue significativamente distinta en ningún grupo experimental. Sin embargo, se conoce que en tejido, la relación entre la concentración de glutatión reducido y glutatión oxidado (GSH/GSSG) está disminuida en la cepa SHR (Gómez-Amores y cols., 2007) por lo que es de suponer que en el plasma también, aunque en las condiciones experimentales descritas en esta Tesis, no ha sido posible detectar estas diferencias.

En cuanto al tratamiento con LGF, hemos visto que aumentaba significativamente la concentración de glutatión respecto a la rata WKY. Sin embargo no aumentó significativamente la actividad de la enzima GR. Puesto que hemos demostrado que el tratamiento disminuye la producción de anión superóxido, es presumible que también disminuyan los niveles de glutatión oxidado, lo que tendría como consecuencia que no aumente su actividad la GR en las ratas tratadas con LGF.

III. REDUCCIÓN DEL DAÑO PRODUCIDO POR ESTRÉS OXIDATIVO POR EL TRATAMIENTO DE RATAS SHR CON LGF

PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Se analizaron dos aspectos relacionados con el daño oxidativo. En primer lugar, se determinó la peroxidación lipídica, puesto que es uno de los aspectos más deletéreos del daño producido por radicales libres, al tratarse de una reacción en cadena. El malondialdehído -uno de los productos más importantes en la oxidación lipídica (Suji y Sivakami, 2008)- se determinó en plasma de ratas WKY, SHR y SHR tratada con LGF. Se ha demostrado en estudios anteriores que la cantidad de peróxidos en plasma de ratas SHR son mayores que los obtenidos de ratas WKY y que son significativamente reducidos tras el tratamiento de los animales con ácido ascórbico (Newaz y cols., 2005). Este dato de la elevación de peroxidación lipídica en la cepa SHR también se ha demostrado en diversos tejidos (Gómez-Amores y cols., 2007). Sin embargo, nuestro estudio demostró que la concentración de MDA fue similar en los tres grupos de ratas. En cuanto a las discrepancias entre los resultados de MDA descritos en esta Tesis y los obtenidos por otros autores, cabe resaltar que los datos de la determinación en plasma de MDA tuvieron una gran variabilidad, relativamente mayor que los obtenidos en otros aspectos del estudio con LGF (reactividad vascular, determinación de anión superóxido, etc). Esto puede deberse a aspectos meramente metodológicos relacionados con la técnica de obtención de muestras o la medición del compuesto mediante TBARS. Sin embargo, también se puede considerar la posibilidad de la existencia de variabilidad de la cepa SHR y WKY, que han propuesto algunos autores (Kurtz y Morris, 1988; Kurtz y cols., 1989; Matsumoto y cols., 1991; Michel y cols., 1993; Paré y Kluczynski, 1997; Deschepper y cols., 1997). Estos estudios indican que pueden existir importantes diferencias en la presión arterial y otros parámetros cardiovasculares entre ratas procedentes de diversas casas comerciales, particularmente entre la casa

comercial Charles River (USA) e Iffa-Credo (Francia). Las cepas WKY y SHR utilizadas en esta Tesis que se crían en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid procedían en su origen de la casa comercial Charles River (USA). Regularmente nuestro grupo de investigación realiza medidas de presión arterial de ambas cepas para asegurarse de que difieren en dicho parámetro. Durante el período de estudio de esta Tesis, los datos de presión arterial obtenidos de ambas colonias no han demostrado variabilidad. Sin embargo, existe la posibilidad de que en algunas ocasiones en el Animalario se compren ratas (por falta de animales) a través de Iffa-Credo (Francia). Esta posibilidad, junto con el hecho de que se han demostrado diferencias significativas en el sistema Renina-Angiotensina en las ratas SHR procedentes de estas dos casas comerciales (Michel y cols., 1993) podría justificar la variabilidad encontrada en las determinaciones de MDA, ya que la angiotensina II juega un papel central en algunos aspectos fisiopatológicos de la cepa SHR.

IV. PROTECCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO FRENTE A RADICALES LIBRES DE OXÍGENO

Por otra parte, como se dijo anteriormente, el radical superóxido reacciona con el NO, compuesto derivado del endotelio, destruyéndolo. En un estudio anterior con tratamiento con LGF de ratas SHR se observó que se mejoraban las relajaciones de las arterias carótidas a ACh (Somoza y cols., 2006). Estos datos podrían indicar que el tratamiento con LGF mejora la biodisponibilidad de NO. Se realizó un estudio de la biodisponibilidad de NO mediante microscopía confocal y tinción con DAF2-DA. Estos datos de medida directa del NO, demostraron que efectivamente en las arterias carótidas de ratas tratadas con LGF la biodisponibilidad de NO basal es mayor que en las arterias de ratas no tratadas. Este efecto parece estar generalizado ya que también se produce en las arterias de resistencia. El hecho de que en ambos lechos vasculares el LGF disminuyó la

producción de radical anión superóxido sugiere que sea este el motivo por el que aumenta la biodisponibilidad de NO.

Estos estudios con DAF2-DA también mostraron la presencia de tinción en la adventicia de las arterias carótidas. El análisis con colorantes nucleares y microscopía confocal demostró que esta tinción en la adventicia correspondía a vasos que sólo tenían una capa de células (endotelio capilar) y que formaban tubos que atravesaban la adventicia. Las grandes arterias tienen vasa-vasorum que aseguran la llegada de nutrientes a su pared arterial (Szasz y cols., 2007). El estudio de la arteria carótida mostró que la mitad de las arterias de las ratas tratadas con LGF tenían vasa-vasorum con producción de NO. En cambio, este fenómeno no se observó en las arterias procedentes de las ratas SHR sin tratar. Esto, por una parte, indicaría que el LGF puede actuar como un factor angiogénico, como ya se ha demostrado en otros estudios (Martinez-Galán y cols., 2005; Martín-Hidalgo y cols., 2007) y que puede elevar la biodisponibilidad del óxido nítrico no solo en la capa endotelial, sino también en la capa adventicia.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que podemos extraer de la presente Tesis son las siguientes:

1. El LGF y sus compuestos constituyentes: albúmina y bilirrubina, tienen efectos antioxidantes por eliminación de diversos radicales libres en medio acuoso, siendo el LGF el que más efecto antioxidante ejerce a menor concentración molar. Esta diferencia puede estar relacionada con un enlace covalente entre la albúmina y la bilirrubina, que produce cambios conformacionales en la molécula de albúmina.
2. El LGF tiene capacidad para eliminar radicales libres biológicos en medio acuoso a muy bajas concentraciones molares.
3. El tratamiento con LGF de ratas hipertensas SHR inhibe la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa y reduce la producción de radical anión superóxido de la pared vascular.
4. El tratamiento con LGF de ratas hipertensas SHR estimula la producción del antioxidante endógeno glutatión en plasma. Sin embargo no se modifica la actividad de la enzima glutatión reductasa, regeneradora de la forma reducida, posiblemente por existir menores concentraciones de radicales libres en las ratas tratadas.
5. El LGF protege al óxido nítrico vascular de la destrucción por el radical anión superóxido, tanto *in vitro* como *in vivo* aumentando su biodisponibilidad.
6. La reducción del estrés oxidativo producida por el tratamiento con LGF en la rata SHR, puede explicar en parte, sus acciones antifibróticas y regenerativas, previamente descritas en el sistema cardiovascular de la rata SHR.

Conclusión general

En conjunto, los resultados de los efectos del LGF descritos en la presente Tesis Doctoral, sugieren que este complejo covalente de albúmina-bilirrubina, puede formar parte de los sistemas antioxidantes endógenos circulantes y podría considerarse como un potencial agente terapéutico en la enfermedad cardiovascular.

REFERENCIAS

- Abakumova OYu, Fedorova LM, Popov AA, Li VS, Arkhangelskaya SL, Bachmanova GI. Effects of albumin-bilirubin complexes with syngeneic or allogeneic albumin on DNA and protein synthesis in liver and spleen of partially hepatectomized rats. *J Hepatol* 21(6):947-52, 1994
- Abraham NG, Asija A, Drummond G, Peterson S. Heme oxygenase -1 gene therapy: recent advances and therapeutic applications. *Curr Gene Ther* 7(2):89-108. 2007
- Adin CA, Croker BP, Agarwal A. Protective effects of exogenous bilirubin on ischemia-reperfusion injury in the isolated, perfused rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 288(4):F778-84, 2005
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-6, 1984
- Aikens J, Dix TA. Perohydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem* 266(23):15091-8, 1991
- Aliaga E, Lissi EA. Reactions of the Radical Cation derived from 2, 2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) with Amino acid. Kinetics and Mechanism. *Can J Chem* 78:1052-9, 2000
- Alleva R, Tomasetti M, Battino M, Curatola G, Littarru GP, Folkers K. The roles of coenzyme Q10 and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfractions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(20):9388-91, 1995
- Alvarez de Sotomayor M, Bueno R, Pérez-Guerrero C, Herrera MD. Effect of L-carnitine and propionyl-L-carnitine on endothelial function of small mesenteric arteries from SHR. *J Vasc Res* 44(5):354-64, 2007
- Amstad P, Moret R, Cerutti P. Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu,Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidant stress. *J Biol Chem* 269(3):1606-9, 1994
- Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH, Karanja N. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure: DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 336:1117-24, 1997
- Arribas SM, González C, Graham D, Dominiczak AF, McGrath JC. Cellular changes induced by chronic nitric oxide inhibition in intact rat basilar arteries revealed by confocal microscopy. *J Hypertens* 15:1685-93, 1997

- Arribas SM, Daly CJ, González MC, McGrath JC. Imaging the vascular wall using confocal microscopy. *J Physiol* 584(Pt1):5-9, 2007
- Atkinson J, Epand RF, Epand RM. Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. *Free Radic Biol Med* 44(5):739-64, 2008
- Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 397:342-4, 2002
- Baccanari DP. Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH. *Arch Biochem Biophys* 191(1):351-7, 1978
- Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Munzel T, Simoons ML and Hamm CW. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 108:1440-5, 2003
- Barja de Quiroga G, Pérez-Campo R, López Torres M. Anti-oxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats. *Biochem J* 272(1):247-50, 1990
- Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 26(5):497-502, 1995
- Bates CJ, Walmsley CM, Prentice A, Finch S. Does vitamin C reduce blood pressure? Results of a large study of people aged 65 or older. *J Hypertens* 16:925-32, 1998
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1620-4, 1990
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1):C1424-37, 1996
- Bélanger S, Lavoie JC, Chessex P. Influence of bilirubin on the antioxidant capacity of plasma in newborn infants. *Biol Neonate* 71:233-238; 1997
- Bensasson R, Land EJ, Maudinas B. Triplet states of carotenoids from photosynthetic bacteria studied by nanosecond ultraviolet and electron pulse irradiation. *Photochem Photobiol* 23(3):189-93, 1976

- Bergström S, Danielsson H, Samuelsson B. Nutrition classics. *Biochimica et Biophysica Acta* 90:207-10, 1964. The enzymic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid. *Prostaglandins and related factors* 32. *Nutr Rev* 39:313-5, 1981
- Bielski BH, Richter HW, Chan PC. Some properties of the ascorbate free radical. *Ann N Y Acad Sci* 258:231-7, 1975
- Bielski BH, Arudi RL, Sutherland MW. A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 258(8):4759-61, 1983
- Biolo G, Antonione R, De Cicco M. Glutathione metabolism in sepsis. *Crit Care Med* 35(9 Suppl):S591-5, 2007
- Bisby RH, Brooke R, Navaratnam S. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chemistry* 108:1002-7; 2008.
- Bohr DF, Dominiczak AF, Webb RC. Pathophysiology of the vasculature in hypertension. *Hypertension*. 18(5 Suppl):III69-75, 1991
- Bompadre S, Leone L, Politi A, Batino M. Improved FIA-ABTS Method for Antioxidant Capacity Determination in Different Biological Sample. *Free Rad Res* 38:831-8, 2004.
- Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol* 23(3):381-90, 2008
- Bourdon E, Blache D. The importance of proteins in defense against oxidation, *Antioxid Redox Signal* 3:293-311, 2001
- Boveris A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B Aires)* 58(4):350-6, 1998
- Bradford C. Berk, Novel Approaches to Treat Oxidative Stress and Cardiovascular Diseases *Trans Am Clin Climatol Assoc* 118:209–14, 2007
- Breusing N, Grune T. Regulation of proteasome-mediated protein degradation during oxidative stress and aging. *Biol Chem* 389(3):203-9, 2008

- Brilla CG, Funck RC, Rupp H. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease. *Circulation* 102(12):1388-93, 2000
- Brito MA, Brites D, Butterfield DA. A link between hyperbilirubinemia, oxidative stress and injury to neocortical synaptosomes. *Brain Res* 1026(1):33-43, 2004
- Briviba K, Klotz LO, Sies H. Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biol Chem* 378(11):1259-65, 1997
- Brown KK, Eriksson SE, Arnér ES, Hampton MB. Mitochondrial peroxiredoxin 3 is rapidly oxidized in cells treated with isothiocyanates. *Free Radic Biol Med* [Epub ahead of print] 2008
- Bucher NRL, Malt RA. Regeneration of Liver and Kidney. pp. 79-113, Little Brown and Co Boston, 1971
- Bund SJ, Lee RM. Arterial structural changes in hypertension: a consideration of methodology, terminology and functional consequence. *J Vasc Res*. 40(6):547-57, 2003
- Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension*. 25(3):305-13, 1995
- Burton GW, Ingold KU. beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224(4649):569-73, 1984
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840-4, 2000
- Cai H, Griending KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 24:471-8, 2003
- Calo LA, Davis PA, Pagnin E, Semplicini A, Pessina AC. NADPH oxidase, superoxide overproduction and nitric oxide bioavailability in essential hypertension. *J Hypertens* 23:665-6, 2005

- Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 14(3):303-11, 1993
- Cao Z, Lindsay JG, Isaacs NW. Mitochondrial peroxiredoxins. *Subcell Biochem* 44:295-315, 2007
- Casado A, Encarnación López-Fernández M, Concepción Casado M, de La Torre R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem Res* 33(3):450-8, 2008
- Cascales M. Estrés oxidativo. Envejecimiento y enfermedad. Madrid Instituto de España, 1999
- Cascales M. La paradoja de la aerobiosis: ¿Por qué es tóxico el oxígeno? Valencia: Cátedra de Eméritos de la Comunidad Valenciana, 2005
- Cathcart MK. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1:23-8, 2004
- Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 8(5-6):691-728. 2006
- Ceriello A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care* 31 Suppl 2:S181-4, 2008
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49(3):481-93, 1993
- Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* 38(3Pt2):606-11, 2001
- Chen ZH, Saito Y, Yoshida Y, Niki E. Effect of Oxygen Concentration on Free Radical-Induced Cytotoxicity. *Biosci Biotechnol Biochem*. Epub ahead of print, 2008
- Cheng Z, Yan G, Li Y, Chang W. Determination of antioxidant activity of phenolic antioxidants in a Fenton-type reaction system by chemiluminescence assay. *Anal Bioanal Chem* 375:376-80, 2003

- Chepelev LL, Eshara CS, MacLean PD, Hatfield GL, Rand AA, Thompson A, Wright JM, Barclay LRC. Polypyrroles as Antioxidants: Kinetic Studies on Reactions of Bilirubin and Biliverdin Dimethyl Esters and Synthetic Model Compounds with Peroxyl Radicals in Solution. Chemical Calculations on Selected Typical Structures. *J Org Chem* 71:22-30, 2006
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42(6):1206-52, 2003
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 31(2):643-8, 1998
- Chung HT, Pae HO, Cha YN. Role of heme oxygenase-1 in vascular disease. *Curr Pharm Des* 14(5):422-8, 2008
- Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ, Motterlini R. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(2):H643-51, 2000
- Clark JF, Sharp FR. Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26(10):1223-33, 2006
- Conde MV, Marín J, Fernandez-Criado C, Balfagón G. Regulation of beta-adrenoceptor-mediated relaxation of the rat aorta is modulated by endogenous ovarian hormones. *Clin Sci (Lond)* 98:381-7, 2000
- Cuevas P, Garcia-Calvo M, Carceller F, Reimers D, Zazo M, Cuevas B, Munoz-Willery I, Martinez-Coso V, Lamas S, Gimenez-Gallego G. Correction of hypertension by normalization of endothelial levels of fibroblast growth factor and nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(21):11996-12001, 1996
- Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28(5):771-99, 2004

- Davalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending Applicability of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC- Fluorescein) Assay. *J Agri Food Chem* 52:48-54, 2004
- Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J* 235(3):747-54, 1986
- Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* 262(20):9895-901, 1987
- Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 61:1-31, 1995
- De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griending KK. Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 3:653-7, 1998
- De Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta*. 1784(1):106-15, 2008
- Dekkers JC, van Doornen LJP, Kemper HCG. The Role of Antioxidant Vitamins and Enzymes in the Prevention of Exercise-Induced Muscle Damage. *Sports Med* 21(3): 213-38, 1996
- Delles C, Miller WM, Dominiczak AF. Targeting reactive oxygen species in hypertension. *Antioxidants Redox signalling* 10:1061-78, 2008
- Deschepper CF, Prescott G, Hendley ED, Reudelhuber TL. Genetic characterization of novel strains of rats derived from crosses between Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats, and comparisons with their parental strains. *Lab Anim Sci*. Dec;47(6):638-46, 1997
- Deshmukh AJ, Patel NJ, Patel RJ. Hydroxyl radical mediates the augmented angiotensin II responses in thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology* 79:122-128, 2007
- Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr* 53(1 Suppl):194S-200S, 1991
- Díaz-Gil JJ, Escartín P, García-Cañero R, Trilla C, Veloso JJ, Sánchez G, Moreno-Caparrós A, Enrique de Salamanca C, Lozano R, Gavilanes JG, et

- al. Purification of a liver DNA-synthesis promoter from plasma of partially hepatectomized rats. *Biochem J* 235(1):49-55, 1986a
- Díaz-Gil JJ, Sánchez G, Santamaría L, Trilla C, Esteban P, Escartín P. Liver DNA synthesis promoter activity detected in human plasma from subjects with hepatitis. *Hepatology* 6(4):658-61, 1986b
- Díaz-Gil JJ, Gavilanes JG, Sánchez G, García-Cañero R, García-Segura JM, Santamaría L, Trilla C, Escartín P. Identification of a liver growth factor as an albumin-bilirubin complex. *Biochem J* 243(2):443-8, 1987a
- Díaz-Gil JJ, Sánchez G, Santamaría L, Trilla C, Esteban P, Escartín P, Gea T. A liver DNA synthesis promoter induced in rat plasma by injection of dimethylnitrosamine (DMNA) or thioacetamide. *Br J Cancer* 55(6):599-604, 1987b
- Díaz-Gil JJ, Sánchez G, Trilla C, Escartín P. Identification of biliprotein as a liver growth factor. *Hepatology* 8(3):484-6, 1988
- Díaz-Gil JJ, Gavilanes JG, García-Cañero R, García-Segura JM, Santamaría L, Trilla C, Martín AM, Guerra MA, García-Escandón F, Iñiguez JA, et al. Liver growth factor purified from human plasma is an albumin-bilirubin complex. *Mol Biol Med* 6(3):197-207, 1989
- Díaz Gil JJ, Rúa C, Machin C, Cereceda RM, García-Cañero R, de Foronda M, Pérez de Diego J, Trilla C, Escartin P. Hepatic growth induced by injection of the liver growth factor into normal rats. *Growth Regul* 4(3):113-22, 1994
- Díaz-Gil JJ, Muñoz J, Albillos A, Rúa C, Machín C, García-Cañero R, Cereceda RM, Guijarro MC, Trilla C, Escartín P. Improvement in liver fibrosis, functionality and hemodynamics in CCl4-cirrhotic rats after injection of the Liver Growth Factor. *J Hepatol* 30(6):1065-72, 1999
- Díaz-Gil JJ, Majano PL, López-Cabrera M, Sánchez-López V, Rúa C, Machín C, Trilla C, García-Cañero R, Moreno-Otero R. The mitogenic activity of the liver growth factor is mediated by tumor necrosis factor alpha in rat liver. *J Hepatol* 38(5):598-604, 2003
- Dickhout JG, Lee RM. Structural and functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 29(3):781-9, 1997
- Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*. 39(1):89-105, 1998

- Dohi Y, Ohashi M, Sugiyama M, Takase H, Sato K and Ueda R. Candesartan reduces oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 26:691-7, 2003
- Donkó A, Péterfi Z, Sum A, Leto T, Geiszt M. Dual oxidases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360(1464):2301-8, 2005
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95, 2002
- Dröge W, Schipper HM. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell* 6(3):361-70, 2007
- Duffy SJ, Gokce N, Holbrook M, Huang A, Frei B, Keaney JF Jr, Vita JA. Treatment of hypertension with ascorbic acid. *Lancet* 354:2048-9, 1999
- Dusting GJ., Selemidis S, Jiang F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol.* 100(Suppl. I): 97-103, 2005
- Elstner EF. Oxygen radicals-biochemical basis for their efficacy. *Klin Wochenschr* 69(21-23):949-56, 1991
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radic Biol Med* 11:81-128, 1991
- Et-Taouil K, Safar M, Plante GE. Mechanisms and consequences of large artery rigidity. *Can J Physiol Pharmacol* 81:205-211, 2003
- Evans TW. Review article: albumin as a drug –biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Alimen Pharmacol Ther* 16(suppl 5):6-11, 2002
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408(6809):239-47, 2000
- Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 15(2):247-54, 2003
- Fisher B, Szuch P, Fisher ER. Evaluation of a humoral factor in liver regeneration utilizing liver transplants. *Cancer Res* 31(3):322-31, 1971b

- Fisher B, Szuch P, Levine M, Fisher ER. A portal blood factor as the humoral agent in liver regeneration. *Science* 171(971):575-7, 1971a
- Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol* 32 Suppl:S22-7, 1992
- Folkow B, Hallbäck M, Lundgren Y, Weiss L. Structurally based increase of flow resistance in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand.* 79(3):373-8, 1970
- Folkow B. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension* 16:89-101, 1990
- Folkow B. Early structural changes in hypertension: pathophysiology and clinical consequences. *J Cardiovasc Pharmacol.*22 Suppl 1:S1-6, 1993
- Foresti R, Goatly H, Green CJ, Motterlini R. Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(5):H1976-84, 2001
- Forgione MA, Cap A, Liao R, Moldovan NI, Eberhardt RT, Lim CC, Jones J, Goldschmidt-Clermont PJ, Loscalzo J. Heterozygous cellular glutathione peroxidase deficiency in the mouse: abnormalities in vascular and cardiac function and structure. *Circulation* 106: 1154-8, 2002
- Fortuño A, Oliván S, Beloqui O, San José G, Moreno MU, Díez J, Zalba G. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. *J Hypertens* 22(11):2169-75, 2004
- Fortuño A, San José G, Moreno MU, Díez J, Zalba G. Oxidative stress and vascular remodelling. *Exp Physiol* 90(4):457-62, 2005
- Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch Physiol Biochem* 113(4-5):234-58, 2007
- Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 41(0):35-97, 1974
- Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44:147-159, 1975

- Gagnon C, Legault F, Geraldès P, Tanguay JF, Lambert C. Diverse effects of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists on prevention of cardiac hypertrophy and collagen distribution in spontaneously hypertensive rats. *Int J Cardiol* 97(3):373-81, 2004
- Galaris D, Pantopoulos K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci* 45(1):1-23, 2008.
- Gautam A, Seligson H, Gordon ER, Seligson D, Boyer JL. Irreversible binding of conjugated bilirubin to albumin in cholestatic rats. *J Clin Invest* 73(3):873-7, 1984
- Genestra M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling* 19:1807-19, 2007
- Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol* 353(1):38-52, 2005
- Girotti AW. Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action. *Free Radic Biol Med* 44(6):956-68, 2008
- Goldberg M, Strecker W, Feeny D, Ruhenstroth-Bauer G. Evidence for and characterization of a liver cell proliferation factor from blood plasma of partially hepatectomized rats. *Horm Metab Res.* 12(3):94-6, 1980
- Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC. Fluorescence probes used for detection oxygen species. *Biochem Biophys Meth* 65:45-80, 2005
- Gómez-Amores L, Mate A, Miguel-Carrasco JL, Jiménez L, Jos A, Cameán AM, Revilla E, Santa-María C, Vázquez CM. L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. *J Nutr Biochem* 18(8):533-40, 2007
- González JM, Somoza B, Conde MV, Fernández-Alfonso MS, González MC, Arribas SM. Hypertension increases middle cerebral artery resting tone in spontaneously hypertensive rats: role of tonic vasoactive factor availability. *Clin Sci (Lond)* 114(10):651-9, 2008
- Goupy P, Vulcain E, Caris-Veyrat C, Dangles O. Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: mechanism of action and synergism. *Free Radic Biol Med* 43(6):933-46, 2007

- Gow AJ, Farkouh CR, Munson DA, Posencheg MA, Ischiropoulos H. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287(2):L262-8, 2004
- Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand* 548:47-63, 1986
- Greene EL, Paller MS. Xanthine oxidase produces O₂⁻ in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am J Physiol* 263(2 Pt 2):F251-5, 1992
- Greger R y Windhorst U. *Comprehensive Human Physiology From. Cellular Mechanisms to Integration*. Springer Berlin, 1996
- Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108(16):1912-6, 2003a
- Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* 108(17):2034-40, 2003b
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86(5):494-501, 2000
- Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, Chevanne M, Vincent S, Sergent O, Cillard J, Gratas-Delamarche A. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 89(1):14-20, 2003
- Guiotto A, Ruzza P, Babizhayev MA, Calderan A. Malondialdehyde scavenging and aldose-derived Schiff bases' transglycation properties of synthetic histidyl-hydrazide carnosine analogs. *Bioorg Med Chem* 15(18):6158-63, 2007
- Guzik TJ, Channon KM. Measurement of vascular reactive oxygen species production by chemiluminescence. *Methods Mol Med* 108:73-89, 2005
- Hall ED, Detloff MR, Johnson K, Kupina NC. Peroxynitrite-mediated protein nitration and lipid peroxidation in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 21:9-20, 2004
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1-14, 1984

- Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The Deoxyribose Method: A Simple "Test-Tube" Assay for Determination of Rate Constants for Reactions of Hydroxyl Radicals. *Anal Biochem* 165:210-5, 1987
- Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun* 9(1):1-32, 1990
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142(2):231-55, 2004
- Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc New York, 2007
- Hamilton C. Nitric oxide, oxidative stress and hypertension: A complex equation. *J Hypertension* 20:1055-6, 2002
- Hamilton CA, Miller WH, Al-Benna S, Brosnan MJ, Drummond RD, McBride MW, Dominiczak AF. Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)* 106(3):219-34, 2004
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 29(Pt 2):345-50, 2001
- Hanes DS, Weir MR, Sowers JR. Gender considerations in hypertension pathophysiology and treatment. *Am J Med* 101(3A):10S-21S, 1996
- Hanna IR, Hilenski LL, Dikalova A, Taniyama Y, Dikalov S, Lyle A, Quinn MT, Lassègue B, Griendling KK. Functional association of nox1 with p22phox in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 37(10):1542-9, 2004
- Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 33(6):774-97, 2002
- Hasnain BI, Mooradian AD. Recent trials of antioxidant therapy: what should we be telling our patients? *Cleve Clin J Med* 71(4):285-8, 2004
- Higashi Y, Yoshizumi M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacol Ther* 102(1):87-96, 2004

- Higashijima H, Yamashita H, Makino I, Kuroki S, Chijiwa K, Tanaka M. Significance of serum delta bilirubin during obstructive jaundice in dogs. *J Surg Res* 66(2):119-24, 1996
- Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1411:378-84, 1999
- Howard SA, Hawkes WC. The relative effectiveness of human plasma glutathione peroxidase as a catalyst for the reduction of hydroperoxides by glutathione. *Biol Trace Elem Res* 61(2):127-36, 1998
- Huang HY, Caballero B, Chang S, Alberg A, Semba R, Schneyer C, Wilson RF, Cheng TY, Prokopowicz G, Barnes GJ 2nd, Vassy J, Bass EB. Multivitamin/mineral supplements and prevention of chronic disease. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* (139):1-117, 2006
- Huie RE, Neta P. Chemistry of Reactive Oxygen Species. *Reactive Oxygen Species in Biological Systems. An Interdisciplinary Approach*. Editors Daniel L. Gilbert and Carol A. Colton. Kluwer Academic Publishers New York 33-63, 1999
- Hunt JV, Bottoms MA, Mitchinson MJ. Ascorbic acid oxidation: a potential cause of the elevated severity of atherosclerosis in diabetes mellitus? *FEBS Lett* 311(2):161-4, 1992
- Hutchinson PJ, Palmer RM, Moncada S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. *Eur J Pharmacol* 141:445-51, 1987
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G. Pharmacological Evidence that Endothelium-Derived Relaxing Factor is Nitric Oxide: Use of Pyrogallol and Superoxide Dismutase to Study Endothelium-Dependent and Nitric Oxide-Elicited Vascular Smooth Muscle Relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 244:181-9, 1988
- Inagi R. Oxidative stress in cardiovascular disease: a new avenue toward future therapeutic approaches. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov* 1(2):151-9, 2006
- Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 3, 179-83, 2000

- Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem Biophys* 298:431-7, 1992
- Ischiropoulos H, al-Mehdi AB. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett* 364(3):279-82, 1995
- Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem Biophys* 356:1-11, 1998
- Janiszewski M, Souza HP, Pedro MA, Zweier JL, Laurindo FRM. Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. *Free Radical Biology & Medicine* 32 (5):446-53, 2002
- Jialal I, Devaraj S. Antioxidants and atherosclerosis: don't throw out the baby with the bath water. *Circulation* 107:926-8, 2003
- Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Isselbacher KJ. *Harrison Principios de Medicina Interna*, 16^a edición. Ediciones Harrison Online en español, McGraw-Hill, 2008
- Keaney JJ, Xu A, Cunningham D, Jackson T, Frei B, Vita JA. Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxidative stress and superoxide generation. *J Clin Invest* 95:2520-9, 1995
- Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension* 33(6):1353-8, 1999
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* 70:2446-53, 1998
- Korkmaz A, Yaren H, Topal T, Oter S. Molecular targets against mustard toxicity: implication of cell surface receptors, peroxynitrite production, and PARP activation. *Arch Toxicol* 80(10):662-70, 2006
- Kowalik-Jankowska T, Rajewska A, Jankowska E, Grzonka Z. Products of Cu(II)-catalyzed oxidation of alpha-synuclein fragments containing M1-D2 and H50 residues in the presence of hydrogen peroxide. *Dalton Trans* (6):832-8, 2008

- Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Review: Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 26(3-4):463-71, 1999
- Kozlov AV, Gille L, Miller I, Piskernik C, Haindl S, Staniek K, Nohl H, Bahrami S, Ohlinger W, Gemeiner M, Redl H. Opposite effects of endotoxin on mitochondrial and endoplasmic reticulum functions. *Biochem Biophys Res Commun* 352(1):91-6, 2007
- Kumar KV, Das UN. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commun* 19(1):59-66, 1993
- Kurtz TW, Morris RC Jr. Biological variability in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 11(1):106, 1988
- Kurtz TW, Montano M, Chan L, Kabra P. Molecular evidence of genetic heterogeneity in Wistar-Kyoto rats: implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 13(2):188-92, 1989
- LaBrecque DR, Bachur NR. Hepatic stimulator substance: physicochemical characteristics and specificity. *Am J Physiol* 242(3):G281-8, 1982
- Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*. 46:244-282, 2007
- Lahera V, Cediél E, De las Heras N, Vazquez-Perez S, Sanz-Rosa D, Vazquez-Cruz B, Cachofeiro V. Endothelial dysfunction in hypertension. *Nefrologia* 23 Suppl 4:3-12, 2003
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 111:1201-9, 2003
- Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285(2):R277-R297, 2003
- Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 95: 588-93, 1997

- Levick S, Loch D, Rolfe B, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM, Brown L. Antifibrotic activity of an inhibitor of group IIA secretory phospholipase A2 in young spontaneously hypertensive rats. *J Immunol* 176(11):7000-7, 2006
- Levine RL, Berlett BS, Moskowitz J, Mosoni L, Stadtman ER. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev* 107(3):323-32, 1999
- Lewis RS, Tamir S, Tannenbaum SR, Deen WM. Kinetic analysis of the fate of nitric oxide synthesized by macrophages in vitro. *J Biol Chem* 270:29350-5, 1995
- Lezza AM, Boffoli D, Scacco S, Cantatore P, Gadaleta MN. Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 205(1):772-9, 1994
- Lin JP, O'Donnell CJ, Schwaiger JP, Cupples LA, Lingenhel A, Hunt SC, Yang S, Kronenberg F. Association between the UGT1A1*28 allele, bilirubin levels, and coronary heart disease in the Framingham Heart Study. *Circulation* 114:1476-81, 2006
- Liu J, Yang F, Yang XP, Jankowski M, Pagano PJ. NAD(P)H oxidase mediates angiotensin II-induced vascular macrophage infiltration and medial hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 5:776-82, 2003
- Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* 97(10):967-74, 2005
- Luscher TF, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens* 3(1):55-8, 1990
- MacLean PD, Drake EC, Ross L, Barclay C. Bilirubin as a antioxidant in micelles and lipid bilayers. Its contribution to the total antioxidant capacity of human blood plasma. *Free Rad Biol Med* 43:600-9, 2007
- Madamanchi NR, Hakim ZS, Runge MS. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J Thromb Haemost* 2:254-67, 2005
- Mahmud A, Feely J. Arterial stiffness and the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 5:102-8, 2004

- Majid DS, Nishiyama A, Jackson KE, Castillo A. Inhibition of nitric oxide synthase enhances superoxide activity in canine kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(1):R27-32, 2004
- Malinski T, Kapturczak M, Dayharsh J, Bohr D. Nitric oxide synthase activity in genetic hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 194(2):654-8, 1993
- Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HAJ, Zanchetti A. Guía Europea de práctica clínica para el tratamiento de la hipertensión arterial 2007. Grupo de Trabajo para el Tratamiento de la Hipertensión Arterial de la Sociedad Europea de Hipertensión (ESH) y de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC). *Rev Esp Cardiol* 60(9):968 e1-e94, 2007
- Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HAJ, Zanchetti A. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of Hypertension* 25(6):1105-87, 2007
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47(3):469-74, 1974
- Martínez-Galán L, Martín-Mosquero MC, Puerto-Nevado L, Peces-Barba G, Díaz-Gil JJ, González-Mangado N. Liver growth factor (LGF) partially reverts the established centriacinar emphysema induced by cadmium chloride (CdCl₂) in rats. Meeting of ATS, San Diego, USA, (Abstract). 2005
- Martín-Hidalgo A, Arenas I, Sacristán S, Huerta L, Díaz-Gil JJ, Carrillo E, Gómez-Pinillos A, Lobo MVT. Rat testis localization of VEGFs and VEGF receptors in control and testicular regeneration stimulated by the liver growth factor (LGF). *FEBS J* (Abstract F1-125), 274s1, 296, 2007
- Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. *Biochemistry* (3rd Edition) Addison-Wesley. Pearson Benjamin Cummings, 1999
- Matsumoto K, Yamada T, Natori T, Ikeda K, Yamada J, Yamori Y. Genetic variability in SHR (SHRSR), SHRSP and WKY strains. *Clin Exp Hypertens A*.13(5):925-38, 1991.

- Mayer M. Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. *Clin Chem* 46:1723-7, 2000
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic Biol Med* 5(5-6):363-9, 1988
- McDonagh AF, Palma LA, Lauff JJ, TaiWing W. Origin of mammalian biliprotein and rearrangement of bilirubin glucuronides in vivo in the rat. *J Clin Invest* 74:763-70, 1984
- Meissner C. Mutations of mitochondrial DNA - cause or consequence of the ageing process? *Z Gerontol Geriatr* 40(5):325-33, 2007
- Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711-60, 1983
- Michel B, Welsch C, Coquard C, Grima M, Barthelmebs M, Imbs JL. Angiotensin converting enzyme variability in hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* 21(4):442-5, 1993
- Miller AA, Drummond GR, Sobey CG. Reactive oxygen species in the cerebral circulation: are they all bad? *Antioxid Redox Signal* 8(7-8):1113-20, 2006
- Min L, Jian-xing X. Detoxifying function of cytochrome c against oxygen toxicity. *Mitochondrion* 7(1-2):13-26, 2007
- Minami Y, Yokoyama K, Bando N, Kawai Y, Terao J. Occurrence of singlet oxygen oxygenation of oleic acid and linoleic acid in the skin of live mice. *Free Radic Res* 42(3):197-204, 2008
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43(2):109-42, 1991
- Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* 811:60-7, 1997
- Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Méd* 92(4):164-9, 1999
- Moncada S. Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361(1469):735-59, 2006

- Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*. 147 Suppl 1:S193-201, 2006
- Moolten FL y Bucher NL. Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation. *Science* 158(798):272-4, 1967
- Moore KP, Darley-USmar V, Morrow J, Roberts LJ. Formation of F2-isoprostanes during oxidation of human low-density lipoprotein and plasma by peroxynitrite. *Circ Res* 77:335-41, 1995
- Morley CG, Kingdon HS. The regulation of cell growth. I. Identification and partial characterization of a DNA synthesis stimulating factor from the serum of partially hepatectomized rats. *Biochim Biophys Acta* 308(2):260-75, 1973
- Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. Redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2:274-8, 2005
- Mulvany MJ. Resistance vessels in hypertension. In: *Textbook of Hypertension*. Oxford. Blackwell Scientific, 1994
- Münzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med* 40(3):180-96, 2008
- Nadal RC, Abdelraheim SR, Brazier MW, Rigby SEJ, Brown DR, Viles JH. Prion protein does not redox-silence Cu²⁺, but is a sacrificial quencher of hydroxyl radicals. *Free Radical Biology & Medicine* 42:79-89, 2007
- Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* 269:16712-9, 1994
- Newaz MA, Yousefipour Z, Nawal NN. Modulation of nitric oxide synthase activity in brain, liver, and blood vessels of spontaneously hypertensive rats by ascorbic acid: protection from free radical injury. *Clin Exp Hypertens* 27(6):497-508, 2005
- Nicolson GL. Metabolic syndrome and mitochondrial function: molecular replacement and antioxidant supplements to prevent membrane peroxidation and restore mitochondrial function. *J Cell Biochem* 100(6):1352-69, 2007

- Nielsen KC, Owman C. Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res* 27(1):33-42, 1971
- Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H, Kosaka H, Hori M. Reduced plasma concentrations of nitrogen oxide in individuals with essential hypertension. *Hypertension* 30(3 Pt 1):405-408, 1997
- Nose K. Role of reactive oxygen species in the regulation of physiological functions. *Biol Pharm Bull* 23(8):897-903, 2000
- Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol* 37(12):2466-71, 2005
- Nyström T. The free-radical hypothesis of aging goes prokaryotic. *Cell Mol Life Sci* 60(7):1333-41, 2003
- Oetti K, Stadlbauer V, Petter F, Greilberger J, Putz-Bankutti C, Hallström S, Lackner C, Stauber RE. Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta* (e-pub ahead of print), 2008.
- Ogawa S, Mori T, Nako K, Kato T, Takeuchi K, Ito S. Angiotensin II type 1 receptor blockers reduce urinary oxidative stress markers in hypertensive diabetic nephropathy. *Hypertension* 47(4):699-705, 2006
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27:282-93, 1963
- Oldham PD, Pickering G, Roberts JA, Sowry GS. The nature of essential hypertension. *Lancet* 1(7134):1085-93, 1960
- Ollinger R, Wang H, Yamashita K, Wegiel B, Thomas M, Margreiter R, Bach FH. Therapeutic applications of bilirubin and biliverdin in transplantation. *Antioxid Redox Signal* 9(12):2175-85, 2007
- Palatini P, Julius S. Elevated heart rate: a major risk factor for cardiovascular disease. *Clin Exp Hypertens* 26(7-8):637-44, 2004
- Palmer RM, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158(1):348-52, 1989

- Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 87(5):1468-74, 1993
- Paravicini TM, Chrissobolis S, Drummond GR, Sobey CG Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. *Stroke* 35(2):584-9, 2004
- Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2:S170-80, 2008
- Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 71(2):247-58, 2006
- Paré WP, Kluczynski J. Differences in the stress response of Wistar-Kyoto (WKY) rats from different vendors. *Physiol Behav.* Sep;62(3):643-8, 1997
- Parfenova H, Leffler CW. Cerebroprotective functions of HO-2. *Curr Pharm Des* 14(5):443-53, 2008
- Paul D, Leffert H, Sato G, Holley RW. Stimulation of DNA and Protein Synthesis in Fetal-Rat Liver Cells by Serum from Partially Hepatectomized Rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(2):374-377, 1972
- Pechánová O, Simko F. The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance. *Physiol Res* 56 Suppl 2:S7-S16, 2007
- Perlstein TS, Pande RL, Beckman JA, Creager MA. Serum total bilirubin level and prevalent lower-extremity peripheral arterial disease: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999 to 2004. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:166-72, 2008
- Pieri C, Moroni F, Marra M, Marcheselli F, Recchioni R. Melatonin is an efficient antioxidant. *Arch Gerontol Geriatr* 20(2):159-65, 1995
- Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Rad Biol Med* 27:1173-81, 1999
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290-302, 2005

- Pu Q, Neves MF, Viridis A, Touyz RM, Schiffrin EL. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension* 1:49-55, 2003
- Puddu P, Puddu GM, Zaca F, Muscari A. Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta Cardiol* 55(4):221-232, 2000
- Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* 41(6):1211-9, 2005
- Rabani J, Nielsen SO. Absorption spectrum and decay kinetics of O₂⁻ and HO₂ in aqueous solutions by pulse radiolysis. *J Phys Chem* 73:3736-44, 1969
- Rahman Q, Abidi P, Afaq F, Schiffmann D, Mossman BT, Kamp DW, Athar M. Glutathione redox system in oxidative lung injury. *Crit Rev Toxicol* 29(6):543-68, 1999
- Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)* 109(3):217-26, 2005
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26(9-10):1231-7, 1999
- Reed RG, Davidson LK, Burrington CM, Peters T Jr. Non-resolving jaundice: bilirubin covalently attached to serum albumin circulates with the same metabolic half-life as albumin. *Clin Chem* 34(10):1992-4, 1988
- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101(3):746-52, 1990
- Reimers D, Herranz AS, Díaz-Gil JJ, Lobo MV, Paíno CL, Alonso R, Asensio MJ, Gonzalo-Gobernado R, Bazán E. Intrastriatal infusion of liver growth factor stimulates dopamine terminal sprouting and partially restores motor function in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Histochem Cytochem* 54(4):457-65, 2006
- Reyes-Toso CF, Linares LM, Witriw A, Vázquez MB, Ricci CR, Cardinali DP. Antioxidants restore aortic ring relaxation in pancreatectomized rats. *Life Sci* 81:1467-72, 2007

- Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, Walter P, Yaffee M. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta* 1271(1):67-74, 1995
- Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters* 582:1783-7, 2008
- Rodriguez-Martinez MA, Ruiz-Torres, A. Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mechanisms of Ageing and Development*. 6(2):213-22, 1992
- Rubbo H, Parthasarathy S, Barnes S, Kirk M, Kalyanaraman B, Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and lowdensity lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch Biochem Biophys* 324:15-25, 1995
- Russell WE, McGowan JA, Bucher NL. Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets. *J Cell Physiol*. 119(2):183-92, 1984
- Safar ME, Chamiot-Clerc P, Dagher G, Renaud JF. Pulse pressure, endothelium function, and arterial stiffness in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 38:1416-21, 2001
- Safar ME, Levy BI, Struijker-Boudier, H. Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases. *Circulation* 107:2864-9, 2003
- Salonen RM, Nyyssonen K, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Voutilainen S, Rissanen TH, Tuomainen TP, Valkonen VP, Ristonmaa U, Lakka HM, Vanharanta M, Salonen JT, Poulsen HE. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) Study. *Circulation* 107(7):947-953, 2003
- Schiffrin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens* 17:1192-200, 2004
- Schiffrin EL, Touyz R. From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H435-46, 2004

- Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 10(6):1115-26, 2008
- Schwertner HA, Vitek L. Gilbert syndrome, UGT1A1*28 allele, and cardiovascular disease risk: possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. *Atherosclerosis* 198(1):1-11, 2008
- Sevanian A, Wratten ML, McLeod LL, Kim E. Lipid peroxidation and phospholipase A2 activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structural basis for enzyme activation. *Biochim Biophys Acta* 961(3):316-27, 1988
- Shacter E. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol* 319:428-36, 2000
- Shan XQ, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther* 47(1):61-71, 1990
- Singh IN, Sullivan PG, Hall ED. Peroxynitrite-mediated oxidative damage to brain mitochondria: Protective effects of peroxynitrite scavengers. *J Neurosci Res* 85(10):2216-23, 2007
- Slemmer JE, Shacka JJ, Sweeney MI, Weber JT. Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Curr Med Chem* 15(4):404-14, 2008
- Somoza B, Abderrahim F, González JM, Conde MV, Arribas SM, Starcher B, Regadera J, Fernández-Alfonso MS, Díaz-Gil JJ, González MC. Short-term treatment of spontaneously hypertensive rats with liver growth factor reduces carotid artery fibrosis, improves vascular function, and lowers blood pressure. *Cardiovascular Research* 69:764-71, 2006
- Stadtman ER. Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am J Clin Nutr* 54(6 Suppl):1125S-1128S, 1991
- Staessen JA, Wang JG, Birkenhager WH. Outcome beyond blood pressure control? *Eur Heart J* 24(6):504-514, 2003
- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 347(9004):781-786, 1996

- Stocker R, Keaney JJ. New insights on oxidative stress in the artery wall. *J Thromb Haemost* 3(8):1825-34, 2005
- Stocker R. Antioxidant Activities of Bile pigments. *Antiox & Redox Signal* 6:841-9, 2004
- Sudano I, Spieker LE, Hermann F, Flammer A, Corti R, Noll G, Lüscher TF. Protection of endothelial function: targets for nutritional and pharmacological interventions. *J Cardiovasc Pharmacol* 47 Suppl 2:S136-50, discussion S172-6, 2006
- Suji G, Sivakami S Malondialdehyde, a lipid-derived aldehyde alters the reactivity of Cys34 and the esterase activity of serum albumin. *Toxicol in vitro* 22(3):618-24, 2008
- Suthanthiran M, Solomon SD, Williams PS, Rubin AL, Novogrodsky A, Stenzel KH. Hydroxyl radical scavengers inhibit human natural killer cell activity. *Nature* 307(5948):276-8, 1984
- Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension* 25:1083-9, 1995
- Suzuki K, Nakamura M, Hatanaka Y, Kayanoki Y, Tatsumi H, Taniguchi N. Induction of apoptotic cell death in human endothelial cells treated with snake venom: implication of intracellular reactive oxygen species and protective effects of glutathione and superoxide dismutases. *J Biochem* 122(6):1260-4, 1997
- Swales JD. Salt and blood pressure revisited. *J Hum Hypertens* 9(6):517-21, 1995
- Strazzullo P, Puig JG. Uric acid and oxidative stress: relative impact on cardiovascular risk? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17(6):409-14, 2007
- Szasz T, Thakali K, Fink GD, Watts SW. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. *Exp Biol Med* (Maywood) 232(1):27-37, 2007
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 97(22):2222-9, 1998

- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 38(2):S11-4, 2001
- Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42(6):1075-81, 2003
- Terashvili M, Pratt PF, Gebremedhin D, Narayanan J, Harder DR. Reactive oxygen species cerebral autoregulation in health and disease. *Pediatr Clin North Am* 53(5):1029-37, xi, 2006
- Touyz RM, Schiffrin EL. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens* 7:1245-54, 2001
- Touyz RM, Chen X, He G, Quinn MT, Schiffrin EL. Expression of a gp91phox-containing leukocyte-type NADPH oxidase in human vascular smooth muscle cells-modulation by Ang II. *Circ Res* 90:1205-13, 2002
- Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 3:248-52, 2004
- Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 122(4):339-52, 2004
- Touyz RM. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol* 90(4):449-55, 2005
- Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species and hypertension: a complex association. *Antioxid Redox Signal* 10(6):1041-4, 2008
- Trauner M, Fickert P, Stauber RE. Inflammation-induced cholestasis. *J Gastroenterol and Hepatol* 14:946-59, 1999
- Ülker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res* 59(2):488-00, 2003
- Ullricha V, Kissnerb R. Redox signaling: Bioinorganic chemistry at its best. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 100(12):2079-86, 2006

- Ungvari Z, Csiszar A, Huang A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A. High pressure induces superoxide production in isolated arteries via protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase. *Circulation* 108(10):1253-8, 2003
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39:44-84, 2007
- Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res* 18(2):87-98, 1995
- Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol* 144(4):449-58, 2005
- Virdis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension* 40(4):504-10, 2002
- Ward NC, Hodgson JM, Croft KD, Burke V, Beilin LJ, Puddey IB. The combination of vitamin C and grape-seed polyphenols increases blood pressure: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Hypertens* 23(2):427-34, 2005
- Wassink AM, Olijhoek JK, Visseren FL. The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *Eur J Clin Invest* 37:8-17, 2007
- Wazawa T, Matsuoka A, Tajima G, Sugawara Y, Nakamura K, Shikama K. Hydrogen peroxide plays a key role in the oxidation reaction of myoglobin by molecular oxygen. A computer simulation. *Biophys J* 63(2):544-50, 1992
- Weber DS, Rocic P, Mellis AM, Laude K, Lyle AN, Harrison DG, Griendling KK. Angiotensin II-induced hypertrophy is potentiated in mice overexpressing p22phox in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1:H37-42, 2005
- Weiss JS, Gautam A, Lauff JJ, Sundberg MW, Jatlow P, Boyer JL, Seligson D. The clinical importance of a protein-bound fraction of serum bilirubin in patients with hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 309(3):147-50, 1983
- Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med* [Epub ahead of print], 2008

- Wolin, MS. Interaction of oxidants with vascular signalling system. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 20:1430-1442, 2000
- Wu TW, Wu J, Li RK, Mickle D, Carey D. Albumin-bound bilirubins protect human ventricular myocytes against oxyradical damage. *Biochem Cell Biol* 69:638-88, 1991
- Wu R, Millette E, Wu L, De Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 19(4):741-8, 2001
- Wu R, Lamontagne D, De Champlain J. Antioxidative properties of acetylsalicylic acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 105:387-92, 2002
- Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont FJ, Díez J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 6:1395-9, 2001
- Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño A, Díez J. NADPH oxidase-mediated oxidative stress: genetic studies of the p22(phox) gene in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 7(9-10):1327-36, 2005
- Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL, Hazen SL. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* 286(17):2136-42, 2001
- Zhang X, Kim WS, Hatcher N, Potgieter K, Moroz LL, Gillette R, Sweedler JV: Interfering with nitric oxide measurements. 4,5-diaminofluorescein reacts with dehydroascorbic acid and ascorbic acid. *J Biol Chem* 277:48472-8, 2002
- Zimniak P. Detoxification reactions: Relevance to aging. *Ageing Res Rev* [Epub ahead of print], 2008
- Zoccali C, Tripepi G, Mallamaci F. Predictors of cardiovascular death in ESRD. *Semin Nephrol* 25(6):358-62, 2005

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN	Página
Figura 1. Estructura química de la albúmina (Roche y cols., 2008).7
Figura 2. Estructura química de la bilirrubina. (Clark y Sharp, 2006. J Cereb Blood Flow Metab 26: 1234-49).8
Figura 3. Fase de iniciación de la peroxidación lipídica. Adaptado de Hogg y Kalyanaraman, 1999.20
Figura 4. Estructura química del glutatión en forma reducida (GSH).23
Figura 5. Ciclo de óxido-reducción del glutatión. GPx: glutatión peroxidasa, GR, glutatión reductasa, G6FD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.24
Figura 6. Fuentes enzimáticas de producción de radical anión superóxido. (Adaptado de Paravicini y Touyz, 2008)35
Figura 7. Estructura de la NAD(P)H oxidasa (Dusting y cols., 2005)36
MATERIAL Y MÉTODOS	
Figura 8. Distribución temporal de la administración de LGF a las ratas SHR y de salino estéril a las WKY y SHR.50
Figura 9. Cámara de Neubauer y esquema del conteo celular.52
Figura 10. Caracterización de células en cultivo procedentes de arteria carótida de rata. A) Doble tinción con anticuerpo frente a alfa actina (verde) y DAPI (azul). B) Triple tinción frente a desmina (rojo), vimentina (verde) y DAPI (azul). Barra= 40 µm.54
Figura 11. Esquema representativo del método utilizado para la determinación de la producción basal de anión superóxido, basado en la tinción con dihidroetidio (DHE).64

Figura 12. Representación esquemática del modelo experimental utilizado para el registro de la tensión isométrica.72
---	---------

Figura 13. Esquema representativo del método para la determinación de producción basal de óxido nítrico mediante DAF2-DA.75
--	---------

RESULTADOS

Figura 14 A. A1) Inhibición del radical catión ABTS por el LGF, la albúmina, la bilirubina hidrosoluble y el Trolox a distintas concentraciones (ng/μl). A2) Ampliación de la inhibición del radical catión ABTS por el LGF, la bilirubina hidrosoluble y el Trolox. Cada valor es la media de 3 réplicas.79
--	---------

Figura 14 B. B1) Inhibición del radical catión ABTS por el LGF, la albúmina, la bilirubina hidrosoluble y el Trolox a distintas concentraciones (nM). B2) Ampliación de la inhibición del radical catión ABTS por el LGF, la albúmina y la bilirubina hidrosoluble. Cada valor es la media de 3 réplicas.80
---	---------

Figura 15. A) Cinética bifásica de inhibición del radical catión ABTS con el LGF, la bilirubina hidrosoluble y el Trolox. B) Descomposición de la cinética bifásica: a la izquierda la fase rápida, y a la derecha la fase lenta.81
---	---------

Figura 16A. Curvas de caída de fluorescencia inducida por el radical peroxilo generado por AAPH y el efecto del: A1) LGF a distintas concentraciones 1,5 ng/μl, 2,2 ng/μl y 3 ng/μl (0,02μM, 0,03μM y 0,05μM respectivamente), A2) de la seroalbúmina de rata a distintas concentraciones 2,2 ng/μl, 4,5 ng/μl y 9 ng/μl (0,03μM, 0,07μM y 0,14μM, respectivamente), A3) de la bilirubina hidrosoluble a 3 ng/μl (5μM). A4) Comparación del LGF a 3 ng/μl (0,05μM), la seroalbúmina de rata a 9 ng/μl (0,14μM), la bilirubina hidrosoluble 3 ng/μl (5μM) y el Trolox 0,25 ng/μl (1μM). Cada valor corresponde al promedio de tres réplicas.83
--	---------

Figura 16B. Representaciones de las áreas bajo la curva B1) del LGF a distintas concentraciones 1,5 ng/μl, 2,2 ng/μl y 3 ng/μl (0,02μM, 0,03μM y 0,05μM respectivamente), B2) de la seroalbúmina de rata a distintas concentraciones 2,2 ng/μl, 4,5 ng/μl y 9 ng/μl (0,03μM, 0,07μM y 0,14μM, respectivamente), B3) de la bilirrubina hidrosoluble a 3 ng/μl (5μM). B4) Comparación de las áreas bajo la curva del LGF a 3 ng/μl (0,05μM), la seroalbúmina de rata a 9 ng/μl (0,14μM), la bilirrubina hidrosoluble 3 ng/μl (5μM) y el Trolox 0,25 ng/μl (1μM). Cada valor corresponde al promedio de tres réplicas.84
Figura 17A. Capacidad de eliminar radicales hidroxilo A1) del LGF 30 ng/μl (0,45 μM), la seroalbúmina de rata 1000 ng/μl (15 μM) y la bilirrubina hidrosoluble 30 ng/μl (51 μM) frente al antioxidante de referencia Trolox 10 ng/μl (40 μM), *p<0,05 respecto al Trolox; A2) del LGF 30 ng/μl (0,45 μM), la seroalbúmina de rata 1000 ng/μl (15 μM) y la bilirrubina hidrosoluble 30 ng/μl (51 μM), *p<0,05 respecto a la seroalbúmina de rata; análisis estadístico con el test de Student. Cada valor corresponde al promedio de tres réplicas.85
Figura 18A. Cinética de reacción entre el radical hidroxilo y A1) el LGF, la seroalbúmina de rata y la bilirrubina hidrosoluble, a distintas concentraciones (ng/μl), A2) el LGF y la bilirrubina hidrosoluble, a distintas concentraciones (μM). Cada valor corresponde al promedio de tres réplicas.86
Figura 18B. Cinética de reacción entre el radical hidroxilo y el LGF, la seroalbúmina de rata y la bilirrubina hidrosoluble, a distintas concentraciones (μM).87
Figura 19A. A1) Curva de aumento de quimioluminiscencia inducida por radicales hidroxilo y reducción por LGF 14 ng/μl (0,21μM) y 24 ng/μl (0,36μM); y Trolox 0,12 ng/μl (0,48μM). A2) Capacidad antioxidante del LGF 14 ng/μl (0,21μM) y 24 ng/μl (0,36μM); y Trolox 0,12 ng/μl (0,48μM), *p<0,05 respecto al Trolox (test de Student). Cada valor es la media de 3 réplicas.87
Figura 20A. Curvas concentración respuesta a acetilcolina (ACh) en segmentos de arteria carótida de rata normotensa SD. Efecto: A1) del pirogalol 1μM, A2) de la SOD 15 U/ml, A3) del LGF 0,3 nM, y A4) del Tiron 10 mM, sobre las repuestas vasodilatadoras en presencia del pirogalol 1μM, *p<0,05 con respecto al pirogalol; análisis estadístico con el test de Student.89

Figura 21. Cuantos de luz tras la estimulación de la enzima NAD(P)H oxidasa en arterias carótidas de ratas WKY, SHR y SHR tratada con LGF (SHR-LGF). Entre paréntesis se indica el número de ratas utilizado. *p<0,05 con respecto a WKY; # p<0,05 con respecto a SHR sin tratar, análisis estadístico mediante el test de Student.90
Figura 22A. A1) Efecto de la adición de Tiron 10 mM sobre la emisión de cuantos de luz tras la estimulación del enzima NAD(P)H oxidasa por arterias carótidas de ratas WKY, SHR y SHR tratada con LGF (SHR-LGF). A2) Efecto de la concentración de Tiron (10 y 20 mM) sobre la emisión de cuantos de luz tras estimulación del enzima NAD(P)H oxidasa por arterias carótidas de ratas SHR. Entre paréntesis se indica el número de ratas utilizado. +p<0,05 con respecto a 10 mM. Análisis estadístico mediante el test de Student.91
Figura 23. Emisión de cuantos de luz en situación basal en arterias carótidas de ratas WKY, SHR y SHR tratada con LGF (SHR-LGF). Entre paréntesis se indica el número de ratas utilizado. Análisis estadístico mediante el test de Student.92
Figura 24. Tinción con el colorante nuclear DAPI (excitación 364 nm/ emisión a 461 nm, azul) y DHE (radical anión superóxido, excitación 488 nm/ emisión 590 nm, rojo) en CML procedentes de ratas WKY, SHR y SHR tratada con LGF (SHR-LGF). Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal de fluorescencia Leica con un objetivo de x20.93
Figura 25. Fluorescencia media emitida por el DHE en CML en cultivo procedente de arterias carótidas de ratas WKY, SHR y SHR tratada con LGF. La cuantificación se realizó en imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia. Entre paréntesis el número de ratas/cultivos utilizados. *p<0,05 con respecto a WKY, # p<0,05 con respecto a SHR sin tratar. Análisis estadístico mediante el test de Student.94

Figura 26. Tinción con DHE (excitación 488nm/emisión 590nm) en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY, SHR y SHR-tratadas con LGF (SHR-LGF). Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal de fluorescencia con un objetivo de 63x. Barra 20 μ m. Análisis cuantitativo de la cantidad de células de la pared de arterias mesentéricas de resistencia positivas para DHE medidas por unidad de volumen área de la imagen x 25 micras de grosor de la pared vascular). Entre paréntesis se muestra el número de ratas utilizado. *p<0,05 con respecto a WKY, # p<0,05 con respecto a SHR sin tratar. Análisis estadístico mediante el test de Student.95
Figura 27. Concentración de malondialdehído en ratas WKY, SHR y SHR-tratadas con LGF, como parámetro de estrés oxidativo. Entre paréntesis el número de ratas utilizado. Se utilizó el test de Student para el análisis de los resultados.96
Figura 28. Medida de la biodisponibilidad de NO mediante la intensidad de fluorescencia emitida por el colorante fluorescente DAF2-DA en AMR de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con LGF (SHR-LGF). Intensidad de fluorescencia media en arterias mesentéricas de resistencia y ejemplos representativos. Las imágenes corresponden a reconstrucciones de imágenes seriadas obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia y reconstruidas en una imagen única con el programa Metamorph. Barra 20 μ m. Entre paréntesis el número de ratas utilizado. *p<0,05 con respecto a WKY, # p<0,05 con respecto a SHR sin tratar (test de Student).97
Figura 29. Media de la biodisponibilidad de NO mediante la intensidad de fluorescencia emitida por el colorante fluorescente DAF2-DA en arterias carótidas de ratas SHR y SHR tratadas con LGF (SHR-LGF). Intensidad de fluorescencia medida en las células musculares lisas de anillos de arteria carótida de ratas SHR y SHR tratada con LGF y ejemplos representativos. Las imágenes corresponden a reconstrucciones de 10 imágenes seriadas de 1 μ m de grosor, obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia y reconstruidas en una imagen única con el programa Metamorph. Barra 20 μ m. Entre paréntesis el número de ratas utilizado. # p<0,05 con respecto a SHR sin tratar. Análisis estadístico con el test de Student.98

Figura 30A. Imágenes representativas de vasa-vasorum en la adventicia de una arteria carótida de rata SHR tratada con LGF. Las arterias se han teñido con el colorante nuclear DAPI (364/461nm) y DAF2-DA (488/515nm) y se han visualizado con un microscopio confocal de fluorescencia. A1) Anillo de arteria carótida visualizado con un objetivo de x20 a la longitud de onda de excitación del DAF2-DA (izquierda plano superior del anillo en imagen única; derecha reconstrucción de 20 planos consecutivos del anillo). A2) ampliación de la región enmarcada en la figura superior visualizada con un objetivo de x63 (izquierda tinción con el colorante nuclear DAPI y derecha tinción con DAF2-DA).99
---	---------

Figura 31. Cuantificación de glutatión total en plasma de ratas WKY, SHR y SHR tratadas con LGF (SHR-LGF). Entre paréntesis el número de ratas utilizado. *p<0,05 con respecto a las ratas WKY. Análisis estadístico con el test de Student.100
---	----------

Figura 32. Determinación de la actividad glutatión reductasa en ratas WKY, SHR y SHR tratadas con LGF (SHR-LGF). Entre paréntesis el número de ratas utilizado. Análisis estadístico con el test de Student.101
---	----------

TABLAS

Tabla 1. Valores de vida media de algunos radicales libres presentes en los sistemas biológicos.12
---	---------

Tabla 2. Clasificación de la hipertensión arterial según los niveles de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) de la población, *según la Guía Europea (<i>European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guideliness Committee 3, ESH/ESC, J Hypertens. 2003; 21:1011-1053</i>) y **la Guía Americana (<i>7^o Joint National Comitee, JNC-7; Chobanian y cols. JAMA 2003; 289:2560-2572</i>).32
---	---------